

Herstellung und Charakterisierung schallaktiver Polymerpartikel im nanoskaligen Bereich

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Matthias Wojcik

aus Głogów/Polen

Marburg/Lahn 2017

Erstgutachter: **Prof. Dr. Udo Bakowsky**

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Frank Runkel**

Eingereicht am **01.11.2017**

Tag der mündlichen Prüfung am **13.12.2017**

Hochschulkennziffer: 1180

Die vorliegende Arbeit entstand
auf Anregung und unter Leitung von

Prof. Dr. Udo Bakowsky

am Institut für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
der Philipps-Universität Marburg

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	7
1.1	<i>Geschichte der medizinischen Bildgebungsverfahren</i>	7
1.2	<i>Polymere.....</i>	11
1.2.1	Einführung und Grundlagen.....	11
1.2.2	Polymere in der Medizin	14
1.2.3	Polybutylcyanoacrylat (PBCA).....	21
1.3	<i>Ultraschall.....</i>	23
1.3.1	Geschichte und die physikalischen Grundlagen	23
1.3.2	Bildgebungsverfahren	26
1.4	<i>Zielsetzung der Doktorarbeit</i>	28
2	MATERIALIEN.....	29
2.1	<i>Geräte und Chemikalien.....</i>	29
3	METHODEN.....	31
3.1	<i>Herstellung der Nanopartikel.....</i>	31
3.1.1	Herstellung von Triton-X 100 Lösungen	31
3.1.2	Herstellung von Tween 80 (Polysorbat 80) Lösungen	31
3.1.3	Anionische Polymerisation im Reaktor	32
3.1.4	Fraktionierung der Nanopartikel	34
3.1.5	Gefriertrocknung	34
3.2	<i>Charakterisierung der Nanopartikel.....</i>	34
3.2.1	Dynamische Lichtstreuung.....	34
3.2.2	Laser-Doppler-Anemometrie	36
3.2.3	Rasterkraftmikroskopie	37
3.2.4	Dispersionsanalyse	38
3.3	<i>Stabilitätsstudien der Nanopartikel.....</i>	41
3.3.1	Messung der Lagerstabilität	41
3.4	<i>Herstellung der Nanobubbles.....</i>	41
3.4.1	Ultraschallspitze	41
3.5	<i>Charakterisierung der Nanobubbles.....</i>	43
3.5.1	Laserdiffraktometrie.....	43
3.5.2	Rasterkraftmikroskopie	43
3.5.3	Rasterelektronenmikroskopie.....	44
3.5.4	Transmissionselektronenmikroskop.....	45
3.5.5	Lichtmikroskopie	47
3.6	<i>Stabilitätsstudien der Nanobubbles.....</i>	48

3.6.1	Messung der Stabilität.....	48
3.6.2	Einfluss von Natriumchlorid.....	48
3.7	<i>Untersuchung der Echogenizität</i>	49
3.7.1	Messung der Ultraschallverstärkung.....	49
3.8	<i>Biokompatibilität</i>	51
3.8.1	Chorioallantois-Membran-Modell	51
3.8.2	Zellkultur.....	52
4	ERGEBNISSE	53
4.1	<i>Nanopartikel</i>	53
4.1.1	Zentrifugation und Filtration der Nanosuspension	53
4.1.2	Vergleich der beiden Tenside und Rührapparaturen.....	54
4.1.3	Nachfolgende Lagerung	56
4.1.4	Nachfolgende Lyophilisation	57
4.1.5	Einfluss des NaCl-Zusatzes auf Durchmesser und Zetapotential	58
4.1.6	Größenanalyse mittels Rasterkraftmikroskopie	61
4.1.7	Analytische Zentrifuge.....	62
4.1.8	Visualisierung.....	66
4.2	<i>Nanobubbles</i>	70
4.2.1	Charakterisierung der Bubbles.....	70
4.2.2	Visualisierung der Nanobubbles	75
4.3	<i>Biokompatibilität</i>	83
4.3.1	Evaluierung über das CAM Modell	83
4.3.2	Evaluierung über den MTT-Assay	83
4.4	<i>Ultraschallkontrastverstärkung</i>	85
5	DISKUSSION.....	88
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	93
6.1	<i>Zusammenfassung</i>	93
6.2	<i>Ausblick</i>	96
6.3	<i>Summary</i>	97
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	100
8	ANHANG	117
8.1	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	117
8.2	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	119
8.3	<i>Tabellenverzeichnis</i>	122
8.4	<i>Formelverzeichnis</i>	123
8.5	<i>Danksagung</i>	124
8.6	<i>Ehrenwörtliche Erklärung</i>	125

1 Einleitung

1.1 Geschichte der medizinischen Bildgebungsverfahren

Die Geschichte der medizinischen Bildgebung geht zurück auf die Entdeckung der Röntgenstrahlung im November/Dezember 1895 [1] durch Wilhelm Konrad Röntgen. Er arbeitete zu dieser Zeit mit Kathodenstrahlenröhren als er bemerkte, dass die unsichtbaren Strahlen dieser Röhren bestimmte Materialien besser durchdringen konnten als andere [2]. Er soll sich zu Forschungszwecken daraufhin für sechs Wochen in seinem Kellerlabor in Würzburg eingeschlossen haben. In dieser Zeit entdeckte er den größten Teil dessen, was die Wissenschaft in den nächsten zwei Jahrzehnten über Röntgenstrahlen wissen würde. Im Jahre 1901 wurde er hierfür mit dem ersten Nobelpreis der Geschichte für Physik ausgezeichnet. Auf Basis des „Röntgens“ entstanden dann schließlich Filme, welche von Medizinern zur Beurteilung von Knochenbrüchen herangezogen wurden.

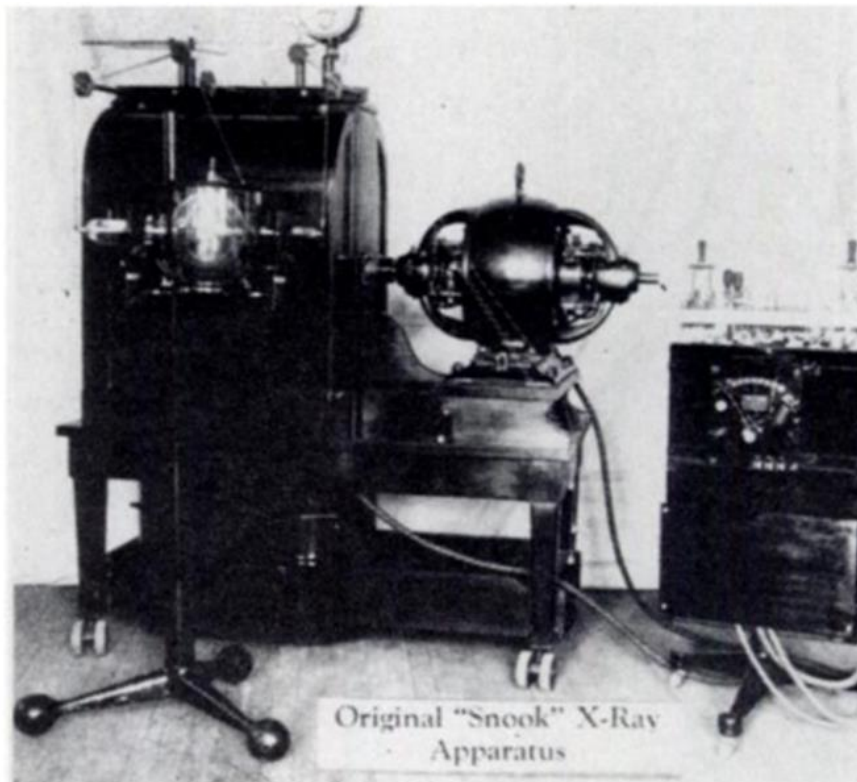
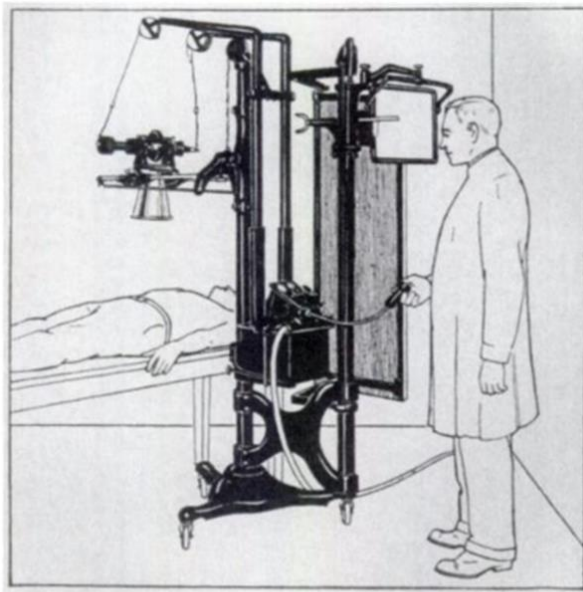
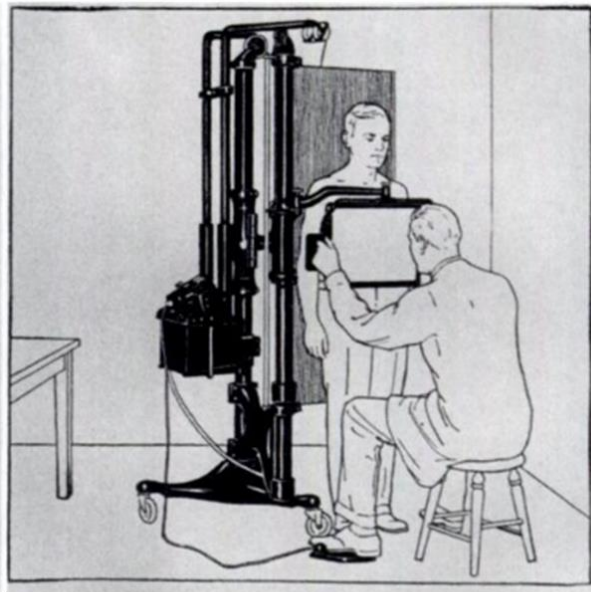


Abbildung 1.1: Altes Röntgengerät (Clyde Snook's Victor Electric Co.), mechanisch aufzufüllen von 1904 [3].

Dabei mussten die damaligen Aufnahmen in einem Dunkelraum entwickelt werden, was dazu führte, dass bei dringenden, schwerwiegenden Fällen diese schon gelesen werden mussten, während die Entwicklungsflüssigkeit abtropfte. Aus dieser Zeit stammt der Begriff des „wet-readings oder wet-read“ [4], welcher heutzutage eine „schnelle vorläufige Antwort auf eine klinische Frage“ bedeutet. Mit steigender Intensität der Röntgenstrahlen konnten, um die zwanziger Jahre herum, fluoroskopische Aufnahmen gemacht werden. Hierfür wurden dem Patienten radiologisch aktive Proben z.B. oral verabreicht und der Weg dieser durch den Gastrointestinaltrakt auf einem Film festgehalten. So konnten Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts, Geschwüre und Divertikulitis diagnostiziert werden.



radiologische Untersuchung



fluoroskopische Untersuchung

Abbildung 1.2: Radiologischer oder fluoroskopischer Untersuchungsaufbau in den dreißiger Jahren [3].

Da die damaligen Aufnahmen so dunkel waren, trugen die Radiologen rote Brillen um die Akkumulationszeit der Augen nach Anziehen des Fluoroskopie-Anzugs zu minimieren [4]. Heutzutage hat die Computertomographie (CT) die Fluoroskopie weitestgehend ersetzt. Die Röntgenstrahlung bildet auch die Basis für die jetzige Mammographie [5], wobei hochauflösende Bilder der Brust angefertigt werden um Brustkrebs zu diagnostizieren. Im Laufe der Jahre konnte

durch Fortschritte in der Technik die notwendige Strahlendosis stark reduziert und somit gleichzeitig die Patientensicherheit erhöht werden. Die Auswertung der Untersuchungsergebnisse geschieht heute vollautomatisch in sogenannten „Full Field Digital Mammography“-Stationen [6].

Die Röntgentomographie wurde in den 1940er Jahren eingeführt und ermöglichte es, Tomogramme, d.h. Schnitte/Scheiben durchs Gewebe zu erhalten, was durch eine Drehung der Röntgenröhre erreicht wurde. Aus der Tomographie gingen die derzeitig angewandten Techniken wie Computertomographie (CT) [7] oder Magnetresonanztomographie (MRT) [8] hervor.

Durch Röntgenstrahlung ist es auch möglich Blutgefäße abzubilden [9]. In früheren Tagen wurde z.B. Iod direkt in die Arterie als Kontrastmittel injiziert. Bei Verletzungen des Gehirns, Verdacht auf Schlaganfall, Hirntumoren oder Gefäßmissbildungen erforderte dies üblicherweise eine Punktion der Karotis. Die hierfür verwendete Nadel hatte den Durchmesser eines handelsüblichen Strohhalmes. Einen Fortschritt brachte in den 1950er Jahren die „Seldinger-Technik“ [10], bei der die Punktion der Arteria femoralis die in der Leiste vorgenommen wird und damals am schwedischen Karolinska-Institut von Sven-Ivar Seldinger entwickelt wurde. Hierbei wird ein flexibler Führungsdraht über die Punktionsnadel eingeführt, sodass über einen am Ende befindlichen Kunststoffkatheter Kontrastmittel injiziert werden konnte [11]. Auf diese Weise war es möglich, Verengungen der Gefäße der Halsschlagader oder der Koronargefäße zu diagnostizieren. Heutzutage werden Stents in, durch spezielle Katheter, erweiterte Gefäße gesetzt, um diese offen zu halten.

In den 1950er Jahren betrat die Nuklearmedizin das Feld unserer heutigen diagnostischen Bildgebung [12]. Sie nutzt als radioaktive Quelle keine Röntgenröhre, sondern radioaktive Verbindungen, die typischerweise Gammastrahlen emittieren, wenn sie zerfallen. Der wichtigste nuklearmedizinische Test ist heutzutage die Positronen-Emissions-Tomographie (PET-Scan) [13,14]. Anstatt Gammastrahlen werden beim Zerfall der Isotope, wie z.B. ^{18}F [15], ^{11}C [16], ^{13}N [17], ^{15}O [18] oder ^{82}Rb [19,20] Positronen emittiert. Positronen haben die gleiche Masse wie Elektronen, sind jedoch positiv geladen. Die Verbindung des Positrons mit einem lokalen Elektron emittiert zwei Photonen in entgegengesetzter Richtung, was durch einen Detektor um den Patienten herum erfasst wird. Durch die Ermittlung der Ankunftszeit der zwei Photonen kann

so die Emissionsquelle in X-Y-Z-Richtung bestimmt werden. Das am häufigsten verwendete Isotop ist das von Fluor, welches an ein Glukose-Analogon gebunden ist (Fluorodeoxyglukose [21]). Die meisten Krebsarten haben eine gesteigerte Glukoseaufnahme, sodass das FDG-PET Scanning eine heutzutage etablierte Methode ist, um sowohl primäre [22] wie sekundäre Tumore [23] zu diagnostizieren. Die Kombination aus PET-Scan und CT (PET-CT [24,25]) ist eine vielversprechende Methode, um Informationen aus dem PET-Scan mit der hohen räumlichen Auflösung des CT's zu verbinden, was die Lokalisation für Biopsien, Strahlentherapie oder Operation deutlich erleichtert [26].

Durch den Einzug von CT und MRT in die Welt der medizinischen Bildgebung in den Siebzigern änderte sich vieles auf dem Gebiet der Diagnostik [27]. Die CT war ein Meilenstein diesbezüglich, da sie erstmals ermöglichte mehrere tomographische Bilder des Gehirns auf einmal aufzunehmen. Im Grunde gab es bis dahin keine oder nur begrenzte Möglichkeiten, das Gehirn auf Bildern darzustellen. Hierfür dreht sich während einer CT-Messung die Röntgenröhre um den Patienten und verschiedene Detektoren um den Patienten herum detektieren die Röntgenstrahlen, die beim Durchgang nicht absorbiert oder reflektiert werden. Hierbei werden jodierte Lösungen als Kontrastmittel verwendet, welche über die Niere wieder ausgeschieden werden. Die früheren CT-Apparaturen erzeugten nur Bilder mit kleinsten Auflösungen und Größen von 64x64 Pixel. Die heutigen Multidetektor row CT's [28] haben Auflösungen im Submillimeterbereich. Die CT-Diagnostik half in den folgenden Jahren erheblich, individuellere Therapieansätze für einzelne Patienten zu schaffen, sie genauer gestalten und durchführen zu können. Bei Brustschmerzen konnte das CT die Ursache genauer Abklären und nicht bei jedem Patienten mussten aus diesem Grund Notfallmaßnahmen ergriffen werden. Ganzkörper CT-Scans können heute schon in wenigen Sekunden durchgeführt werden und sind aus unserer heutigen Notfalldiagnostik nicht mehr wegzudenken [29]. Schlaganfälle [30,31] und Blutungen des Gehirns [32-34] sind weitere Anwendungsgebiete für die CT.

Die MRT entwickelte sich ebenfalls in den siebziger/achtziger Jahren weiter [35]. Sie hat im Gegenteil zu den anderen Methoden den Vorteil, dass keine Strahlung oder jodierte Kontrastmittel eingesetzt werden müssen. Während eines MRT-Scans schließen sich die Protonen des Wasserstoffs, welche normalerweise ohne anliegendes magnetisches Feld zufällig ausgerichtet wären, der Ausrichtung des erzeugten magnetischen Feldes axial an und erzeugen

somit einen magnetischen Vektor. Angewandte magnetische Feldstärken betragen 0,5-3 Tesla [36]. Durch Anlegen zusätzlicher Energie (Radiofrequenzwelle) wird der Vektor wieder abgelenkt. Wird die Energiequelle ausgeschaltet, kehrt der Magnetvektor in seinen vorherigen Ausgangszustand zurück und erzeugt somit ein Signal, welches über spezielle Empfängerspulen aufgefangen wird. Durch Verwendung von verschiedenen elektrischen Gradientenspulen und verschiedenen Frequenzen kann so unterschiedliches Gewebe in Resonanz gebracht werden und wird somit auf Querschnittsbildern sichtbar [37,38]. Da sich bei vielen Gefäßerkrankungen ein erhöhter Wassergehalt feststellen lässt, eignet sich das MRT hervorragend zur Diagnostik. Blutungen des Gehirns [39], sowie Blugefäßerkrankungen [40,41] (MRT-Angiographie) und die Traumatologie [42] sind die heutigen Anwendungsgebiete der MRT.

In den frühen achtziger Jahren wurde erstmals der Ultraschall als bildgebende Methode in der Klinik verwendet. Im Gegensatz zur Röntgenstrahlung verwendet der Ultraschall keine ionisierende Strahlung, sondern Schallwellen. Wenn die Schallwellen durch Gewebe verlaufen, werden sie reflektiert und können so zur Erzeugung von Bildern und zur Charakterisierung des anstrahlenden Gewebes benutzt werden. Auf diese Weise können verschiedenste Gewebearten unterschieden (z.B. Tumorgewebe von gesundem Gewebe) und somit die Therapie besser angepasst werden. [43] Als nichtinvasive Methode wird Ultraschall auch zur Untersuchung und Darstellung des Fötus während der Schwangerschaft [44], der Aorta abdominalis [45,46] oder als Wachstumsfaktor für Knochen genutzt [47,48]. Die früheren klinischen Geräte waren riesig und nicht tragbar und hatten eine niedrige Auflösung [49]. Heute gibt es tragbare Einheiten in Rucksackgröße mit axialen und lateralen Auflösungsgrenzen im Millimeterbereich und Eindringtiefen von bis zu 20cm.

1.2 Polymere

1.2.1 Einführung und Grundlagen

Der Umgang mit dieser Stoffklasse wird schon seit Jahrhunderten dokumentiert, jedoch ist die Wissenschaft hinter den Polymeren im Vergleich dazu noch relativ jung. Erst in den dreißiger Jahren gelang es durch die Forschung von Hermann Staudinger auf dem Gebiet der makromolekularen Chemie, für welche er einen Nobelpreis erhielt, ein Verständnis für die

Materialklasse zu erhalten [50]. In kurzer Zeit entwickelte sich die noch junge Wissenschaft zu einem interdisziplinären Arbeitsgebiet. Sie vereint die einzelnen Naturwissenschaften Physik, Chemie und Biologie miteinander, genauso wie sie Schnittpunkte mit anderen Disziplinen wie der Medizintechnik und der Ingenieurstechnik liefert. Eines der uns bekanntesten Polymere ist gleichzeitig das für uns wichtigste: die DNA. Ohne dieses einzigartige Polymer wäre ein „Leben“ wie wir es kennen nicht möglich. Weitere wichtige Polymere sind die Proteine, die an vielen biologischen Stoffwechselprozessen beteiligt sind, als Katalysatoren fungieren [51], zur Stabilität beitragen oder die Zelle als Membranproteine durch ihre Interaktionsmöglichkeiten mit der Umgebung unterstützen [52]. Der größte Vorteil der Stoffklasse der Polymere ist ihre Vielfältigkeit bezüglich ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften. So können einige Polymere die Zugfestigkeiten von Metallen erreichen [53], andere wiederum als Polster fungieren und weich und schaumartig sein [54]. Zudem lassen sich die Leitfähigkeit des elektrischen Stroms [55], sowie die Dichte und der Schmelzpunkt variieren. Diese Eigenschaften können durch eine Vielzahl von Möglichkeiten beeinflusst werden. Es kann auf den Grad der Polymerisierung, die Art der Verbindung und auf das eingesetzte Monomer, sowie auf die Architektur und die Wechselwirkungen der Ketten untereinander Einfluss genommen werden. Der Einbau von Copolymeren, ebenso wie die Abfolge der Monomere im Polymer haben zudem Einfluss auf die Stoffeigenschaften [56].

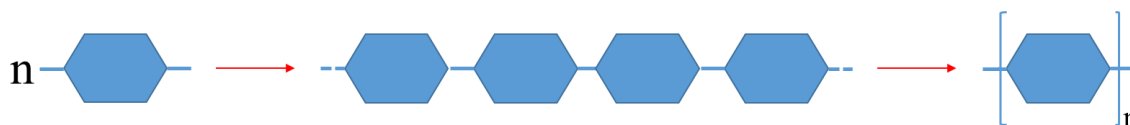
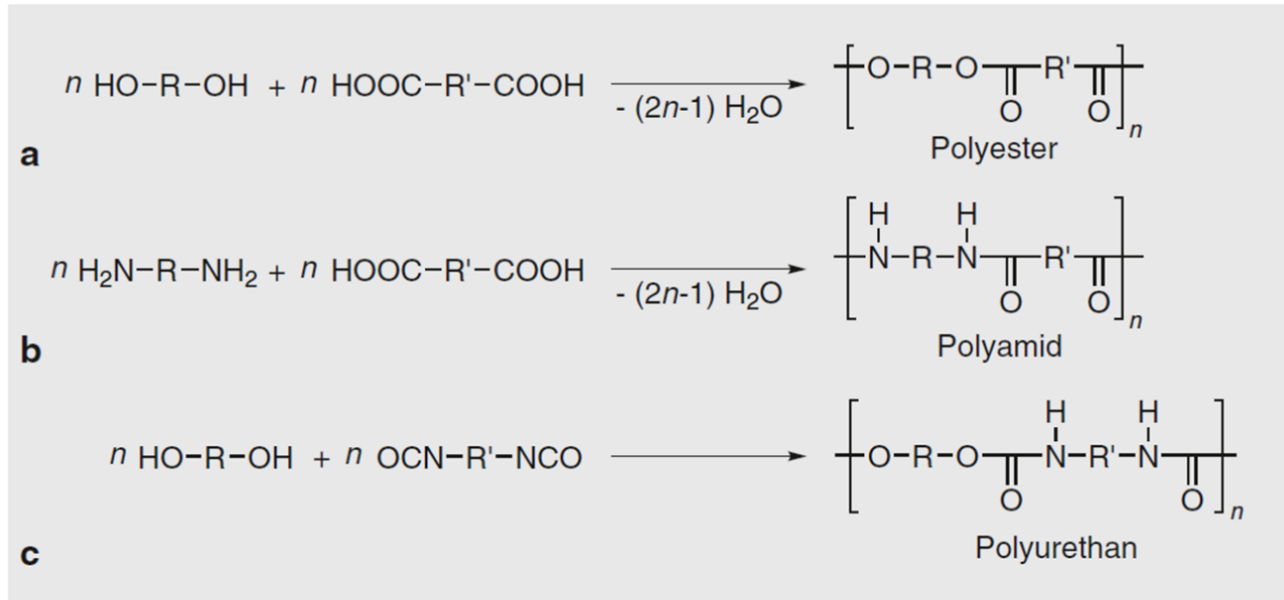


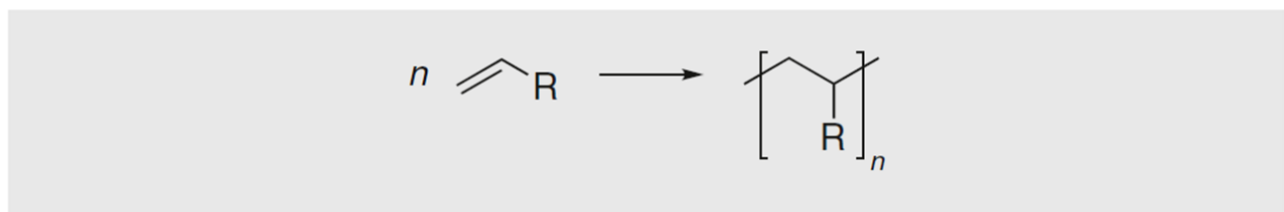
Abbildung 1.3: Vereinfachter Aufbau eines Polymers aus n Monomeren.

Polymere sind auf das aus dem griechischen stammende Wort „poly“, was „viele“ bedeutet zurückzuführen und lassen sich grundsätzlich über zwei verschiedene Reaktionswege gewinnen. Während die Kettenwachstumsreaktionen radikalische Polymerisation und anionische/kationische Polymerisation durch Addition von polymerisationsfähigen Gruppen (Doppelbindungen, Ringöffnung) an aktivierten Monomere stattfinden, findet bei den Stufenwachstumsreaktionen Polykondensation und Polyaddition eine Ausbildung einer

chemischen Bindung zwischen zwei funktionellen Gruppen statt [57]. Die entstehenden Architekturen können hierbei in eine Vielzahl von verschiedene Gruppen eingeteilt werden, z.B. verzweigte, unverzweigte oder isomerisierte Polymere.



Herstellung von **a** Polyestern, **b** Polyamiden und **c** Polyurethanen



Polymerisation einer olefinisch ungesättigten Verbindung

Abbildung 1.4: Schema von Stufenreaktionen bei Polyestern, Polyamiden und Polyurthanen (oben) und Kettenwachstumsreaktion (unten) [56].

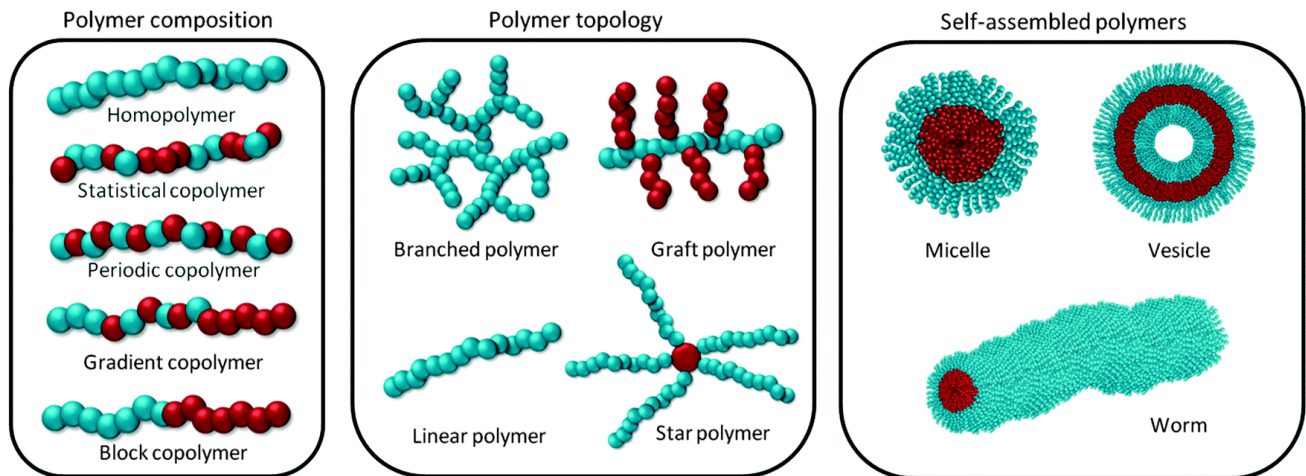


Abbildung 1.5: Übersicht über Polymerisationsmöglichkeiten und deren Architekturen [57].

1.2.2 Polymere in der Medizin

Polymere finden in unserer heutigen Medizin eine große Anzahl an Anwendungsmöglichkeiten. Sie sind bei der Stabilisierung von Gewebe beteiligt [58], dienen als Transportmittel für Arzneistoff und sind z.B. Materialien von Stents [59, 60]. Die Art der bioabbaubaren Polymere hat die Möglichkeit eine Wirkung auszulösen und dadurch abgebaut zu werden [61]. Abbauende Polymere ebenso wie Polymere, die auf Umweltbedingungen oder äußere Reize reagieren, sind heutzutage aus der Medizin nicht mehr wegzudenken. Durch ihre Fähigkeiten auf Temperaturänderungen [62-64], Lichtbestrahlung [65-67], Elektrizität [68-70] und pH-Änderungen [71-73] zu reagieren eignen sie sich hervorragend, um als aktivierbare Transportsysteme zu fungieren, die ihre „Fracht“ aufgrund extern angebrachter Reize freilassen. Eine enzymatische Freisetzung [74-76] ist ebenso wie eine Kombination mehrerer Fähigkeiten möglich [73,77,78].

Polyolefine

Die Polyolefine, unter welche hauptsächlich Polyethylene (PE) und Polypropylene (PP) fallen, werden in der Medizin vor allem für Implantate verwendet. Ihre molare Masse kann sich sehr

stark unterscheiden (Low-Density PE: 50000-200000; High-Density PE 2000000) [79].

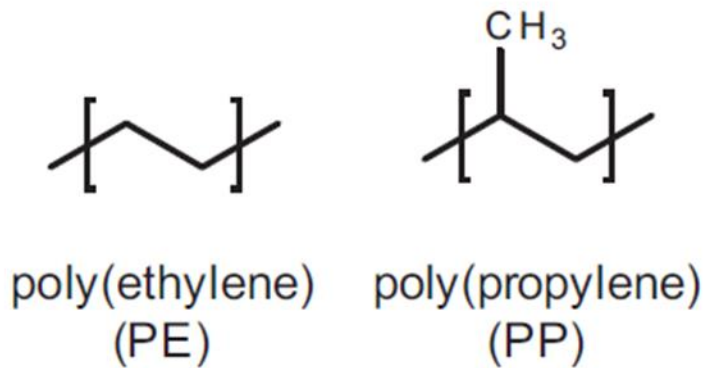


Abbildung 1.6: Chemische Struktur der Polyolefine [80].

Polytetrafluoroethylene (PTFE, Teflon[®])

PTFE wird vorwiegend zur Herstellung von mikroporösen Membranen zur medizinischen Anwendung verwendet [81]. Diese können Porengrößen von 0,01µm bis zu mehreren Mikrometern haben und zur Filtration von Partikeln und Bakterien genutzt werden. Polytetrafluoroethylene sind außerdem inert und schwer abbaubar und finden deshalb schon seit geraumer Zeit Verwendung im „soft-tissue“ replacement [82]. Als „soft-tissue“ wird weiches Gewebe bezeichnet, welches Organe und andere Strukturen im Körper umgibt, verbindet oder unterstützt.

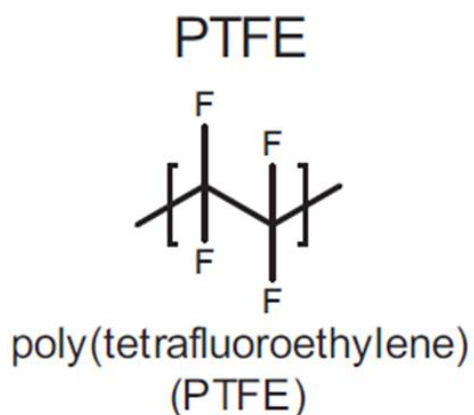


Abbildung 1.7: Chemische Struktur von Teflon[®] [80].

Polyvinylchlorid (PVC)

PVC wird aufgrund seines Herstellungsprozesses heutzutage kaum noch in der Medizin verwendet. PVC braucht zur Stabilisierung Hilfsstoffe, wie Metalle (Zn^{2+}) oder Phthalate, um während der Herstellung nicht zu zerfallen [83] und das PVC zu einem formbaren Material, welches für Infusionsbeutel benutzt wird [84], zu formen. Für die Kombination aus Zinn und den verwendeten Phthalaten wurde jedoch eine direkte Toxizität nachgewiesen [85].

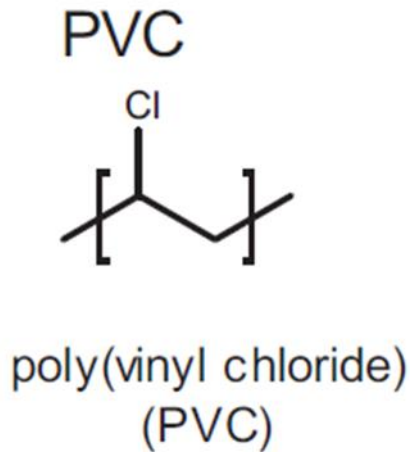


Abbildung 1.8: Chemische Struktur von Polyvinylchlorid [80].

Silikone

Silikone werden in der Medizin schon mehr als 60 Jahre verwendet. Die Fähigkeit von Methylchlorsilan als Beschichtung von Glas zu dienen, um Blut von der Gerinnung abzuhalten, wurde in den fünfziger Jahren entdeckt [86]. Silikone können flüssig (Silikonöl), als Gele oder als gummiartige Strukturen vorliegen. Die Herstellung erfolgt vorwiegend über die Müller-Rochow-Synthese, wobei Kupfer als Katalysator genutzt wird und keine Metalle oder Phthalate nötig sind. Sie werden in Ophthalmika [87] oder in Brustimplantaten verwendet. Zusätzlich können sie als Filme genutzt werden, um als Hautersatz zu dienen [88,89].

Silicone

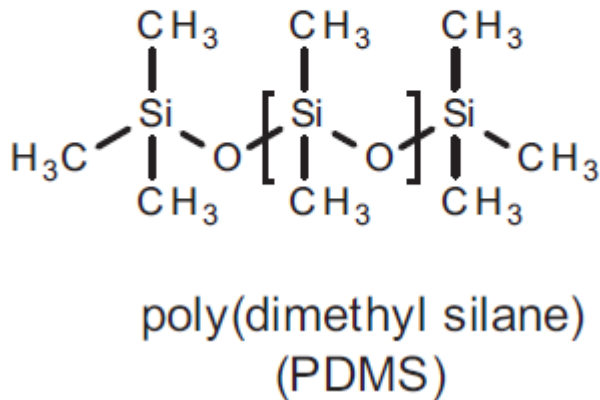
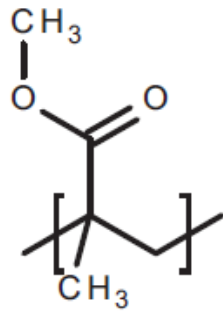


Abbildung 1.9: Chemische Struktur der Silikone [80].

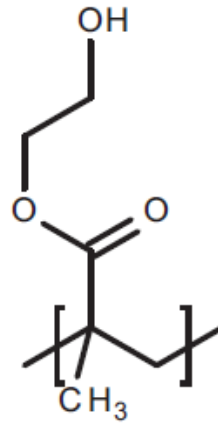
Polyacrylate

PMMA (Polymethylmethacrylat) wird vorwiegend in der Zahnmedizin und Orthopädie [90] verwendet. Das bekannteste Produkt aus PMMA ist Plexiglas[®], welches von Dr. Otto Rohm im Jahre 1933 patentiert wurde. PMMA findet als Knochenzement Einsatz und steigert die Widerstandsfähigkeit gegenüber einer neuen Fraktur auf 167% ohne, dass die Knochen dabei an Elastizität verlieren [91]. Zudem erhöht PMMA in Knochenimplantaten die Wachstumsrate der Knochenzellen im umliegenden Gewebe [92]. Das Hydrogel pHEMA [93] (Poly(ethyl)hydroxymethacrylat) findet in Kontaktlinsenmitteln und als Beschichtung Verwendung.

Polyacrylates



poly(methyl methacrylate)
PMMA



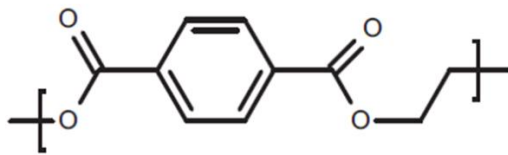
poly(hydroxyethyl methacrylate)
(pHEMA)

Abbildung 1.10: Chemische Struktur der Polyacrylate [80].

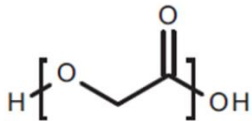
Polyester

Polyester sind sehr verbreitet und finden in vielen Bereichen der Medizin Anwendung. Sie können biologisch stabil, bzw. abbaubar sein und werden als Membran, Gitter oder Filamente verwendet. Als ein sehr wichtiges Polyester-Derivat ist an dieser Stelle PLGA (Polylactidcoglykolid) zu nennen. Es kann zu Glykolsäure und Milchsäure verstoffwechselt werden, welche physiologische Metabolite sind. PLGA ist deshalb ein guter Arzneistofftransporter, welcher passiv oder gezielt seine Zielstrukturen findet [94,95].

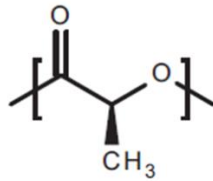
Polyester



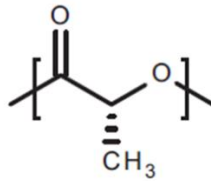
poly(ethylene terephthalate)
(PET, dacron)



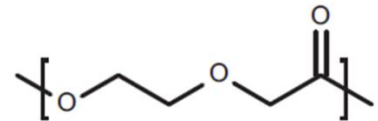
poly(glycolic acid)
(PGA)



poly-L-lactic acid
(PLLA)



poly-L-lactic acid
(PDLA)



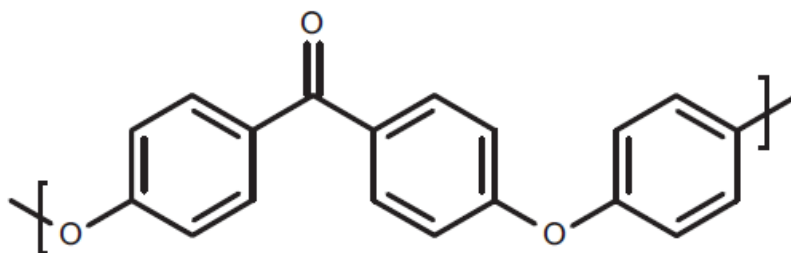
polydioxanone
(PDO)

Abbildung 1.11: Chemische Struktur der Polyester [80].

Polyether

PEEK (Polyetheretherketon) ist der Hauptvertreter dieser Gruppe. Es zeichnet sich durch seine Festigkeit aus und wird in der Zahnmedizin und Orthopädie [96] verwendet. Seine antibakteriellen Eigenschaften finden in einer Vielzahl von Implantaten Anwendung [97].

Polyether



polyether ether ketone
(PEEK)

Abbildung 1.12: Chemische Struktur der Polyether [80].

Polyamide

Das bekannteste Polyamid ist Nylon[®]. Es wird in der Orthopädie und Gefäßchirurgie [98] verwendet. Nach der Kombination mit Copolymeren erreichen Polyamide die Flexibilität von Polyurethanen ohne ihre Festigkeit zu verlieren und finden deshalb als Ballonkatheter in der Gefäßchirurgie Verwendung [99].

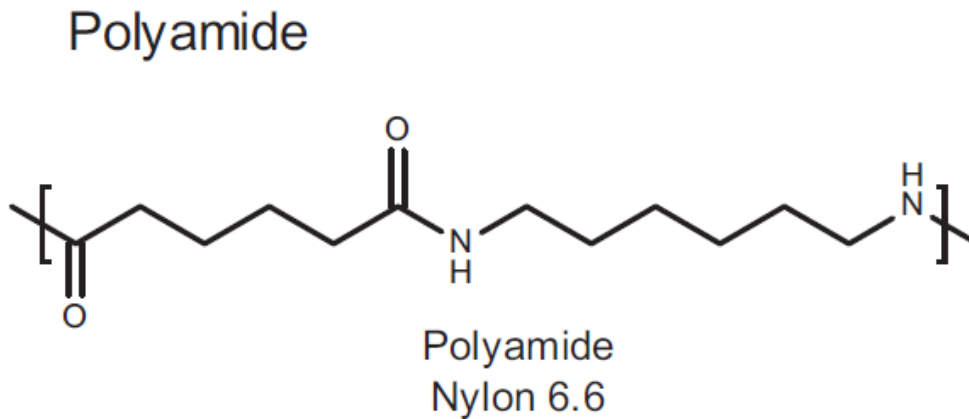
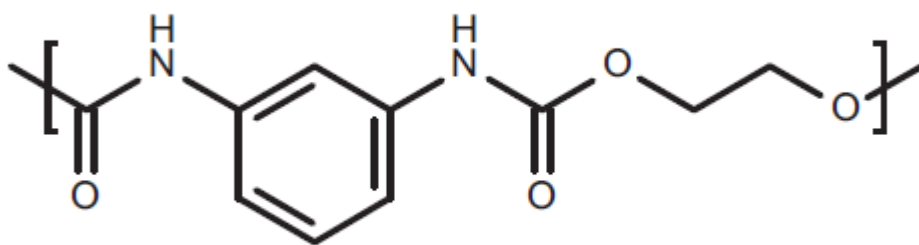


Abbildung 1.13: Chemische Struktur der Polyamide [80].

Polyurethane

Polyurethane werden, wie bereits erwähnt, in der Gefäßchirurgie oder Orthopädie [100] verwendet. Sie werden als Ballonkatheter, Gitterimplantate oder für Kondome [101] verwendet. Eine gute Biokompatibilität konnte für zahlreiche Formulierungen nachgewiesen werden [102, 103].

Polyurethane



Polyurethane

Abbildung 1.14: Chemische Struktur der Polyurethane [80].

1.2.3 Polybutylcyanoacrylat (PBCA)

Die Cyanoacrylate sind eine von Dr. Harry Coover in den fünfziger Jahren entdeckte Stoffklasse. Dieser arbeitete zu jener Zeit an Präzisionsobjektiven für Waffenvorrichtungen, als er die klebrige Substanz entdeckte.

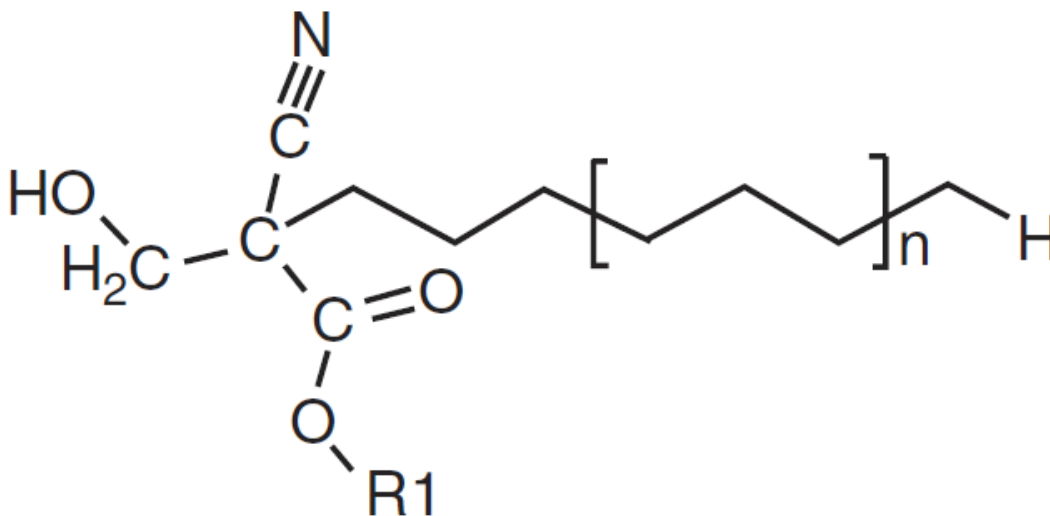


Abbildung 1.15: Chemische Struktur von PBCA. R1=butyl.

Aus dieser Grundsubstanz ging später der sogenannte Sekundenkleber hervor. Histoacryl® ist ein Gewebekleber auf PBCA-Basis, der nach Operationen eingesetzt wird um Wunden zu verschließen. Die klebende Wirkung ist durch die feste Bindung der polymerisierten Monomere zu erklären [104]. Durch die Polymerisation von Monomeren ist es zudem möglich, kleinste nanoskalige Strukturen herzustellen [105]. Dies hat sich die Medizin zunutze gemacht und eine Vielzahl an Verwendungsmöglichkeiten für PBCA Partikel gefunden (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: PBCA-Formulierungen und ihre Verwendungszwecke. NB: Nanobubbles; MB: Mikrobubbles

Formulierung	Verwendungszweck	Zitat
PBCA NP + Allicin	Erhöhung des Antimykotischen Effekts	106
PBCA NP + Mitomycin	verbesserter Transport	107
PBCA NP + Doxorubicin	verbesserter Transport	108
PBCA NP + DNA	DNA Transport	109
PBCA NP + Rivastigmin	verbesserter Transport	110
PBCA NP + Cisplatin	verbesserter Transport	111
PBCA NP + Paclitaxel	Resistenzumgehung	112
PBCA NP + ATP	verbesserter Transport	113
PBCA MB	Kontrastverstärkung	114
PBCA MB	Verstärkung der Thrombolyse	115
PBCA MB	Charakterisierung von pharmakologischen Prozessen	116
PBCA MB + Streptavidin	Molekulare Bildgebung	117
PBCA MB + Stavudin	Blut-Hirn-Schranken-Transport	118
PBCA MB + E-Selektion	Kontrastverstärkung	119
PBCA MB+NB+Farbreagenz	Auflösungsverstärkung	120

1.3 Ultraschall

1.3.1 Geschichte und die physikalischen Grundlagen

Mit einer der ersten Entdeckungen bezüglich des Ultraschalls machte im achtzehnten Jahrhundert ein italienischer Priester. Er entdeckte, dass Fledermäuse zwar mit geschlossenen Augen fliegen können, jedoch nicht mit verstopften Ohren. Erst in den fünfziger Jahren konnte dieses Phänomen durch die Entdeckung von D. Griffin und R. Galambos erklärt werden. Den beiden Wissenschaftlern gelang es die Ultraschallgeräusche der Fledermäuse aufzunehmen. Schon 1826 konnte ein Schweizer Wissenschaftler mit einer unter Wasser getauchten Glocke und einer gleichzeitig ausgelösten Explosion über Wasser die Geschwindigkeit der Schallwellen in Wasser auf annähernd genaue 1435m/s (Wasser 20°C: 1484m/s) berechnen. Jedoch war keine der Erfindungen für den Ultraschall so wichtig wie die Entdeckung des Piezokristalls durch die Curie-Brüder im Jahre 1880. Sie beobachteten, dass durch das Anlegen von mechanischem Druck auf einen Quarzkristall sich ein elektrisches Potential ausbildet [121]. In den 1960er Jahren wurden die ersten synthetischen Piezokristalle hergestellt und werden seitdem überall zur Klangerzeugung genutzt. Eine weitere wichtige Entdeckung auf dem Weg zu unseren heutigen Ultraschallgeräten war im Jahre 1912. Alexander Belm beschrieb damals das erste Gerät zur Erzeugung von Schallwellen unter Wasser und kurze Zeit später, einen Monat nach dem Untergang der Titanic, patentierte der englische Meteorologe Lewis Richardson das erste Sonar. Damals konnten Eisberge aus etwa drei Kilometern entdeckt werden. Die erste Person, die begann, mit Ultraschall Diagnostik zu betreiben, war der Neurologe Karl Dussik. George Ludwig studierte in den fünfziger Jahren die Reflektion von Ultraschall an verschiedenen Geweben. Er war maßgeblich für unser heutiges Wissen über das Konzept der Impedanzen, der idealen Frequenz und der Schalldämpfung durch verschiedene Gewebe verantwortlich. Dabei wird der Zusammenhang zwischen Wellenlänge, Geschwindigkeit und Frequenz in Formel 1.1 dargestellt.

$$\lambda = \frac{c}{f}$$

λ : Wellenlänge (m)

c : Geschwindigkeit (m/s)

f : Frequenz (1/s)

Formel 1.1: Zusammenhang zwischen Wellenlänge, Geschwindigkeit und Frequenz.

Ultraschall besteht aus Schallwellen mit Frequenzen, die oberhalb des vom normalen Menschen wahrnehmbaren Frequenzbereich liegen. Bei der Sonographie, der Ultraschalldiagnostik wird die Reflektion der Schallwellen gemessen, welche an unterschiedlichen Geweben verschieden ist [122]. Dieses Phänomen nennt man Impedanz (Formel 1.2). In Tabelle 1.2 findet sich eine Übersicht ausgewählter Gewebetypen, deren Impedanzen und die zugehörigen Schallgeschwindigkeiten angegeben.

$$Z = c * \rho$$

z : Impedanz

c : Schallgeschwindigkeit

ρ : Dichte

Formel 1.2: Zusammenhang zwischen Impedanz, Schallgeschwindigkeit und Dichte.

Tabelle 1.2: Impedanzen und Schallgeschwindigkeit in unterschiedlichen Gewebearten.

Material/Gewebe	akustische Impedanz [kg*m ² /s]	Schallgeschwindigkeit [m/s]
Luft	430	340
Wasser	1,52x10 ⁶	1484
Knochen	3,75-7,38x10 ⁶	3600
Muskeln	1,65-1,74x10 ⁶	1570
Fettgewebe	1,35x10 ⁶	1540

Die Auflösung der Bilder der Schalluntersuchung hängt maßgeblich noch von einer weiteren Größe ab, dem Reflektionskoeffizienten R (Formel 1.3). Dieser gibt an, wieviel Schall reflektiert wurde. Das beste Auflösungsvermögen erzeugt ein möglichst hoher Reflektionskoeffizient [123]. Daraus resultiert für den Weg zum untersuchenden Körper ein möglichst kleines R und an der Grenzfläche zum Objekt ein möglichst großes. Folglich soll auf dem Weg zum Objekt möglichst wenig Schall reflektiert werden, an der Grenzfläche zum Objekt aber möglichst viel.

$$R = 100 \left(\frac{z_2 - z_1}{z_2 + z_1} \right)^2$$

R: Reflektionskoeffizient

z₁: Impedanz Medium 1

z₂: Impedanz Medium 2

Formel 1.3: Prozentualer Reflektionskoeffizient zur Bestimmung eines guten Auflösungsvermögens.

Bei einer Ultraschalluntersuchung werden die Schallwellen nicht nur reflektiert. Dies liegt daran, dass Gewebe nicht immer glatt ist. An Objekten die beispielsweise im Vergleich zur Wellenlänge des Schalls sehr klein sind, werden die Schallwellen gestreut, wobei die Menge an gestreutem Echo vom Größenunterschied abhängt. Dieses Phänomen nennt man Streuung. Zudem tritt eine Dämpfung der Schallwellen auf, da diese das Gewebe nicht verlustfrei passieren können. Dieses Phänomen heißt Adsorption. Brechung, als dritter nicht gewollter physikalischer Effekt, tritt häufig an glatten Grenzflächen mit sehr hohen Impedanzunterschieden auf. All diese Effekte haben Auswirkungen auf die spätere Bildgebung, welche sich in mehrere verschiedene, je nach Anwendungsanforderungen, Bildgebungsverfahren aufteilen lässt.

1.3.2 Bildgebungsverfahren

A-Mode

Der A-Mode oder Amplitudenmodus ist der erste entwickelte Darstellungsmodus in der Sonographie. Es ist eine sehr einfache Umsetzung, die eine eindimensionale Grafik in einem X-Y-Diagramm erstellt. Dargestellt wird dabei das empfangene Echo gegenüber der Zeit, die Amplitude entspricht dabei der Echostärke. Die Auswertung dieses einfachen Diagramms erfordert genaueste Kenntnisse der einzelnen Gewebe und ihrer Strukturen und wird heute nur noch vereinzelt in der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde eingesetzt, um Verschleimungen der Nasennebenhöhlen zu diagnostizieren.

B-Mode

Der B-Mode steht für Brightnessmode. Dabei werden die Echos nicht mehr als Amplituden dargestellt, sondern als Farbpunkte verschiedener Graustufen/Helligkeiten. Die Amplituden entsprechen jeweils einer punktuellen Erhöhung im Grauwert. Je intensiver dabei das rückstrahlende Echo, desto heller ist die Struktur auf der Darstellung zu erkennen. Mittlerweile können moderne Ultraschallgeräte mehrere hundert Grauwerte zwischen schwarz und weiß erkennen.

M-Mode

Der M-Mode oder Motionmode stellt Zielgewebe an ihrem Ort als Funktion der Zeit dar. Die einzelnen Bildpunkte auf der Darstellung entsprechen den jeweiligen Ausschlägen der Ultraschallechos zu einem bestimmten Zeitpunkt und an einem festgelegten Ort. So kann eine Aussage über die zeitliche Veränderung von bestimmten Strukturen getroffen werden. Die Verfahren nennt man auch Time-Motion-Verfahren, da eine örtliche Veränderung über die Zeit dargestellt wird. Der M-Mode wird hauptsächlich in der Echokardiographie verwendet.

2D-Real-Time-Verfahren

Das 2D-Real-Time Verfahren ist die am häufigsten angewandte Methode in der heutigen Ultraschalldiagnostik. Dieses Verfahren produziert ein aus Einzellinien zusammengesetztes Bild. Die zweidimensionale Darstellung entsteht durch ein Schwenken des Schallstrahls.

1.4 Zielsetzung der Doktorarbeit

Ziel dieser Arbeit war es, auf der Basis der von Olbrich et al. beschriebenen Partikel ein biokompatibles Ultraschallkontrastmittel im nanoskaligen Bereich zu entwickeln, welches sich nach Möglichkeit für eine Ultraschallkontrastverstärkung eignen würde.

Im ersten Schritt wurde das Tensid Triton X-100 ausgetauscht. Triton X-100 ist als Zellgift bekannt, welches schon in geringen Konzentrationen die Zellvitalität beeinflusst. Ist die Tensidkonzentration des Triton X-100 unter seiner kritischen mizellaren Konzentration (CMC), kann Triton X-100 die Penetration erhöhen. Werden die Zellen jedoch zu lange dem Tensid ausgesetzt, kann das schon zu vereinzeltem Zelltod führen. Ist die Konzentration über der CMC, kollabiert die gesamte Zellstruktur [124].

Der zweite Schritt bestand in der Charakterisierung der hergestellten Nanopartikelformulierungen und dem Vergleich der beiden Tenside Triton X-100 und Tween 80. Die daraus entstandenen Nanopartikel wurden bezüglich ihres hydrodynamischen Durchmessers und ihres Zetapotentials untersucht. Eine Visualisierung der entstandenen Partikel fand im Anschluss über ausgewählte Methoden statt [125-126].

Die Herstellung des Ultraschallkontrastmittels folgte als dritter Schritt. Hierbei wurden die zuvor hergestellten Nanopartikel durch Ultraschallapplikation zu Nano- und Mikrobubbles geformt [127,128]. Die entstandenen Formulierungen wurden erst in ihrer Gänze bezüglich Größe [129,130], Aussehen [131] und Stabilität untersucht.

Der vierte Schritt beinhaltete die Fraktionierung der Bubble-Formulierung und die Untersuchung der Nanobubbles. Da die meisten bisherigen ultraschallkontrastverstärkenden Formulierungen im Mikrometerbereich liegen [132] und nur wenige nanoskalige Formulierungen beschrieben sind, war es notwendig, eine ausgiebige Charakterisierung der Formulierungen zu machen, um Fehlinterpretationen zu vermeiden. Dieser Schritt beinhaltete auch die Messung der Ultraschallkontrastverstärkung an dem von Brüßler et al. beschriebenen Modell [133].

Da die Biokompatibilität große Bedeutung hat [134,135], befasste sich der fünfte und letzte Schritt damit, die biologische Verträglichkeit anhand von speziellen Methoden zu untersuchen. Es wurden zur Sicherheit zwei verschiedene Systeme zur Untersuchung herangezogen [136-138].

2 Materialien

2.1 Geräte und Chemikalien

Geräte	Laborreaktor IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
	Rasterelektronenmikroskop S-510 Hitachi Ltd., Tokyo, Japan
	Rasterkraftmikroskop Nanowizard 1 JPK Instruments AG, Berlin, Deutschland
	Zetasizer NanoZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Großbritannien
	Mastersizer 3000, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Großbritannien
	LUMiSizer, LUM GmbH, Berlin, Deutschland
	Transmissionselektronenmikroskop JEOL 3010, 300 kV, JEOL GmbH, Freising, Deutschland
	Ultraschallgerät eZono 3000, eZono AG, Jena, Deutschland
	Ultraschallstab Bandelin Sonoplus GM 3100, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
	Gefriertrockner Alpha 1-4 LSC, Martin Christ, Osterode am Harz, Deutschland
	Lichtmikroskop Olympus Bx53, Olympus Europa SE & CO. KG, Hamburg, Deutschland
	Mikroplattenreader FluoStar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
	Brand Transferpette 100-1000µl
	Brand Transferpette 10-200µl
	Brand Transferpette 1-10µl

Chemikalien	Histoacryl®, B.Braun Melsungen, Melsungen; Deutschland
	Tween 80, Simga-Aldrich, St. Louis, USA
	Triton X-100, BioRad, Hercules, Kalifornien, USA
	konzentrierte Salzsäure (37%), Merck, Darmstadt, Deutschland
	Natriumhydroxid, Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
	Natriumchlorid, Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
	PBS, Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
	MTT Reagenz, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
	Chloroform, Merck, Darmstadt, Deutschland
	Methanol, Merck, Darmstadt, Deutschland

3 Methoden

3.1 Herstellung der Nanopartikel

3.1.1 Herstellung von Triton-X 100 Lösungen

Für die Nanopartikelherstellung wurde zunächst die jeweils nötige Menge (v/v) Triton X-100 (Abbildung 3.1) in MilliQ Wasser vollständig gelöst. Zur Beschleunigung des Lösevorgangs stand das Becherglas bei einer Rührgeschwindigkeit von 500rpm und einer Temperatur von 20°C auf einer Magnetrührplatte. Durch Zugabe von zuvor hergestellten NaOH- und HCl-Lösungen (jeweils 1mol/l) konnte der gewünschte pH-Wert eingestellt werden. Zur anionischen Polymerisation wurde die Lösung in den vorbereiteten Reaktor überführt.

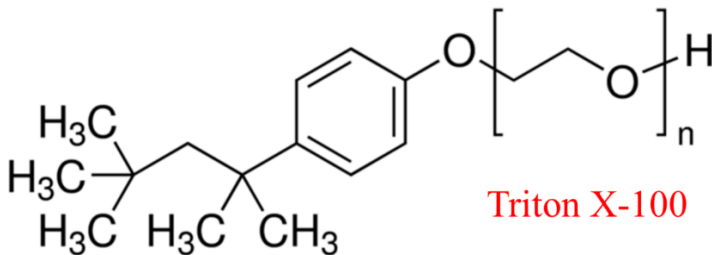


Abbildung 3.1: Chemische Formel von Triton X-100, welches als Tensid verwendet wird.

3.1.2 Herstellung von Tween 80 (Polysorbat 80) Lösungen

Die entsprechenden Mengen des Tensides wurden in MilliQ-Wasser gelöst und der pH-Wert analog zu 3.1.1 eingestellt. Die Herstellung der Polymerpartikel fand unter Zugabe der jeweiligen Tween 80 (Abbildung 3.2) Lösung ebenfalls in einem vorbereiteten Reaktor statt.

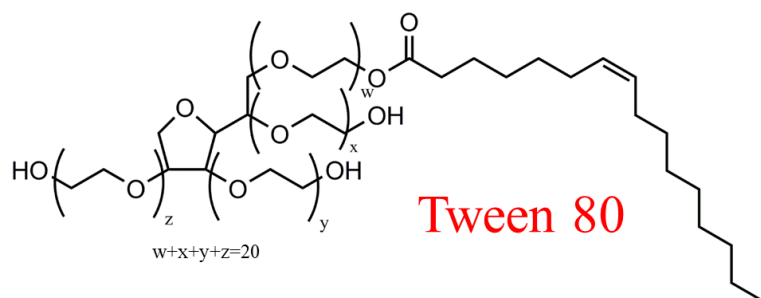


Abbildung 3.2: Chemische Formel von Tween 80, welches ebenfalls als Tensid verwendet wird.

3.1.3 Anionische Polymerisation im Reaktor

Die eigentliche Herstellung der Nanopartikel mit dem jeweiligen Tensid fand in einem Reaktor (Abbildung 3.3) statt und folgte der in Abbildung 3.4 dargestellten Reaktionsgleichung. Zur Sicherstellung der gewünschten Temperatur, zu Beginn der Reaktion, wurde das Kühlaggregat frühzeitig eingeschaltet. Nach Überführung und Temperierung der sauren Tensid-Lösung konnte das PBCA (Polybutylcyanoacrylat) zugegeben und damit die Polymerisation gestartet werden. Eine gleichmäßige Polymerisation hing außer von der Temperatur auch von der Rührgeschwindigkeit im Reaktor ab. Eine Geschwindigkeit von 250rpm und eine Temperatur von 2°C führten dabei zu guten Ergebnissen. Um eine vollständige Polymerisation zu gewährleisten folgten nach 2h Reaktionszeit bei 2°C weitere 22h Reaktionszeit bei Raumtemperatur. Zur Beendigung der Polymerisation nach 24h wurde die Nanopartikelsuspension aus dem Reaktor in ein Becherglas umgefüllt und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

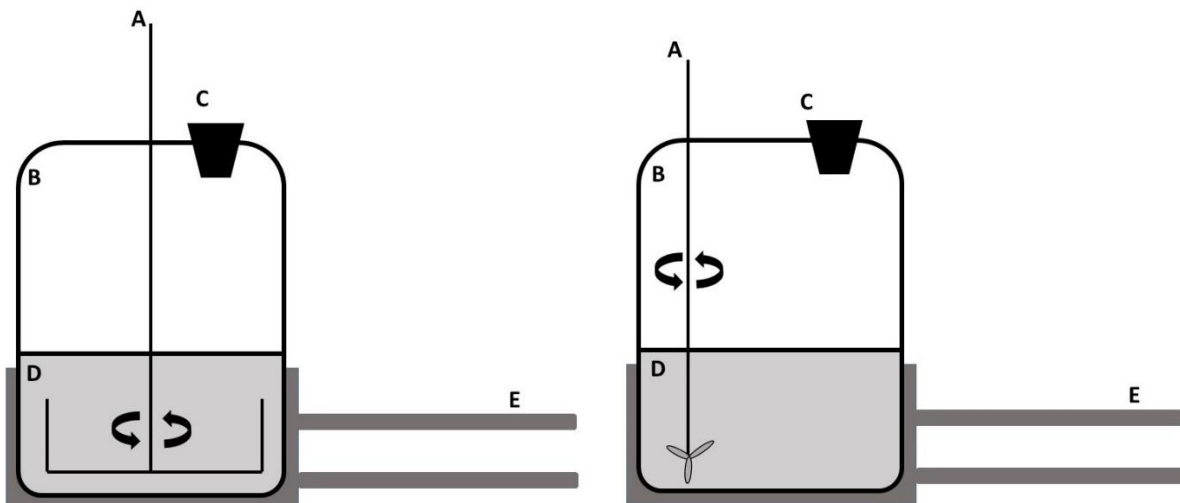


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau des Reaktors zur Nanopartikelherstellung. A: Rührwerkzeug mit regelbarer Geschwindigkeit (links Lamellen, rechts Propeller); B: Reaktor; C: Einlasstopfen für PBCA; D: saure Tensidlösung, E: Kühlaggregat mit Kühlkreislauf.

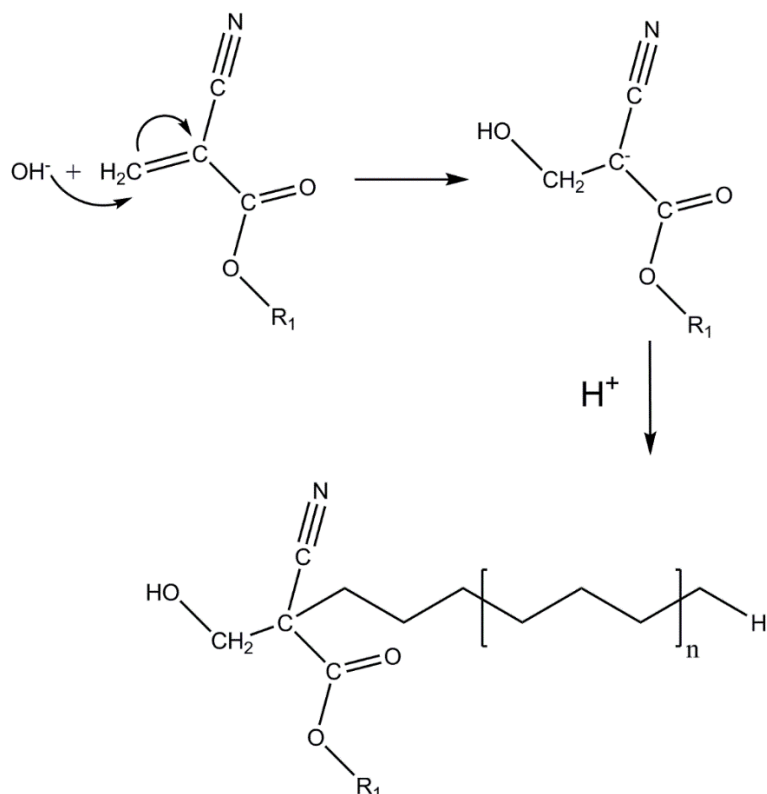


Abbildung 3.4: Reaktionsgleichung der anionischen Polymerisation von n-Butylcyanoacrylat.

3.1.4 Fraktionierung der Nanopartikel

Eine Abtrennung der großen Polymeragglomerate war notwendig, um eine möglichst enge Größenverteilung der hergestellten Polymerpartikel zu erhalten. Hierfür wurde die Nanopartikelsuspension zuerst durch einen 50µm Celluloseacetatfilter vorgefiltert werden, um somit für die nachstehende Zentrifugation bei 6000rpm für 3 x 15min vorbereitet zu werden. Eine weitere Verbesserung der Ergebnisse konnte durch mehrmaliges Überführen des Überstandes in neue Probenbehältnisse erreicht werden. Eine weitere Fraktionierung der Nanopartikel geschah im Anschluss durch mehrere 0,22µm Sterilfilter. Die erhaltenen Nanopartikel wurden bei 4°C gelagert.

3.1.5 Gefriertrocknung

Zur Vorbereitung auf die Lyophilisation mussten 2ml der jeweiligen Nanopartikelsuspension in 20ml Glasfläschchen überführt werden. Eine perforierte Aluminiumfolie diente als Schutz, um die Verteilung der Nanopartikel im Lyophilisationsraum zu verhindern. Im Anschluss wurden die Nanopartikel in einer 0,1 % (v/v) Tensidlösung resuspendiert gelagert.

3.2 Charakterisierung der Nanopartikel

3.2.1 Dynamische Lichtstreuung

Der Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Großbritannien) wurde benutzt um die Größe, in diesem Fall den hydrodynamischen Durchmesser, der Nanopartikel zu bestimmen. Hierfür nutzt man das Prinzip der dynamischen Lichtstreuung (DLS). Die Brownsche Molekularbewegung führt dazu, dass sich Partikel in Medien bewegen. Je kleiner der Partikel, desto schneller bewegt er sich durch das Medium. Das Licht welches auf dieses Partikel trifft, wird gestreut (Rayleigh-Streuung). Zeitlich gesehen ändert der kleinere Partikel (Abbildung 3.5) die Intensität des Streulichts schneller als ein größerer (Abbildung 3.5). Die Stokes-Einstein-Beziehung (Formel 3.1) beschreibt dieses Phänomen.

$$D = \frac{k_B * T}{6 * \pi * \eta * R_0}$$

k_B : Boltzmann – Konstante

T: Temperatur

D: Diffusionskoeffizient

R_0 : hydrodynamischer Radius

η : dynamische Viskosität des Lösungsmittels

Formel 3.1: Stokes-Einstein-Beziehung zur Berechnung des hydrodynamischen Durchmessers.

Über sie ist es möglich, den hydrodynamischen Durchmesser zu errechnen. Das Photonenkorrelationsspektroskop arbeitet mit einem HeNe Laser bei 633nm (10mW) und einem Detektor im Winkel von 173° (Nano ZS). Weitere Parameter wie Messposition des Lasers und Abdunkelungsgrad des Laserstrahls durch die integrierte Blende nahm das Gerät selbst vor. Für die Messung wurden die Nanopartikellösungen in 1000µl Küvetten (DTS1060; Malvern Instruments) überführt, die Ausgleichszeit auf 90s und die Zieltemperatur der Messung auf 25°C eingestellt. Es wurden jeweils drei Messungen durchgeführt, die jeweils zwölf Durchläufe hatten. Jede Messung dauerte 15s. Angegeben sind jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Proben.

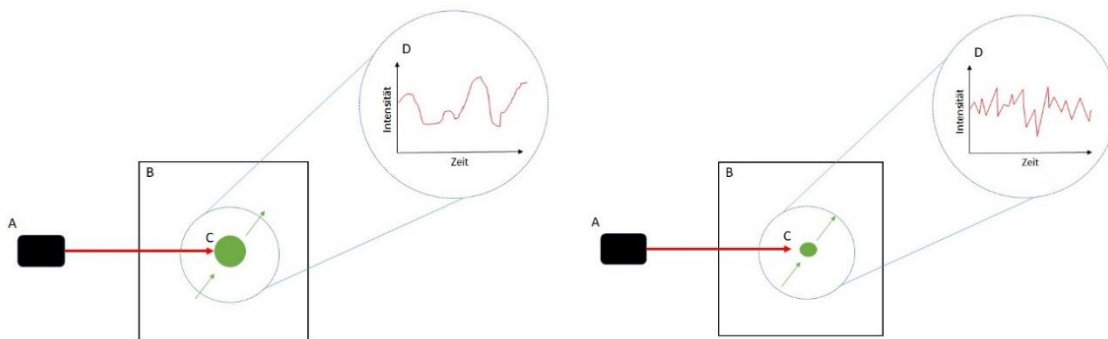


Abbildung 3.5: Prinzip der dynamischen Lichtstreuung anhand großer (obere Abbildung) und kleiner (untere Abbildung) Partikel. A: Laser mit Wellenlänge von 633nm; B: Küvette (DTS 1060); C: großer oder kleiner Partikel; D: Intensitätsänderung des Laserstrahls nach Auftreffen auf große oder kleine Partikel gegenüber der Zeit.

3.2.2 Laser-Doppler-Anemometrie

Das Zetapotential der nach 3.1.4 hergestellten Nanopartikel wurde mit dem Zetasizer Nano ZS bestimmt. Bei dieser Methode wird die Probe ebenfalls von einem Laserstrahl (monochromatisch) durchstrahlt. Zusätzlich wird über die Elektroden der Küvette ein elektrisches Feld erzeugt, welches die Partikel wandern lässt. Diese Partikelwanderung führt zu einer Abdunkelung des Laserlichts. Die spezielle Bauweise des Zetasizer (HeNe-Laserstrahl wird zu Beginn geteilt und dann einmal über einen variablen und einmal über einen festen Spiegel auf die Probe geleitet) führt zur Ausbildung des Doppler-Effekts über den sich die Geschwindigkeit v berechnen lässt. Aus der Geschwindigkeit errechnet sich die elektrophoretische Beweglichkeit (Formel 3.2) und über die Umstellung der Formel der elektrophoretischen Beweglichkeit (Formel 3.3) das Zetapotential.

$$U_e = \frac{v}{E}$$

U_e : elektrophoretische Beweglichkeit

v : Geschwindigkeit

E : elektrische Feldstärke

Formel 3.2: Gleichung der elektrophoretischen Beweglichkeit.

$$U_e = \frac{2}{3} * \frac{\varepsilon * \zeta * f(ka)}{\eta} \Leftrightarrow \zeta = \frac{3}{2} * \frac{U_e * \eta}{\varepsilon * f(ka)}$$

U_e : elektrophoretische Beweglichkeit

ε : Dielektrizitätskonstante

ζ : Zetapotential

$f_{(ka)}$: Henry Funktion

η : Viskosität des Dispersionsmediums

Formel 3.2: Gleichung der elektrophoretischen Beweglichkeit nach dem Zetapotential aufgelöst.

Messparameter bestimmte das Gerät erneut selbstständig, die Ausgleichszeit betrug 90s und die Zieltemperatur der Messung 25°C. Die Proben wurden in PBS (pH 7,4), verdünnt im Verhältnis 1:100 (v/v). Es wurden drei voneinander unabhängige Proben vermessen und der Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

3.2.3 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (engl. atomic force microscopy – AFM) ist die Methode der Wahl, um die Oberflächenstruktur von Systemen zu untersuchen. Eine an einem Messkopf geführte nanoskopische Nadel tastet die zu untersuchende Oberfläche in einem vordefinierten Lesebereich und über ein vordefiniertes Raster ab. Die Kräfte zwischen Nadel und Beschaffenheit der Oberfläche führen dazu, dass die abtastende Spitze (Cantilever) sich verbiegt. Der auf den Cantilever gerichtete Laserstrahl wird durch diese Verbiegung abgelenkt was am Photodetektor, dem Lesekopf, erfasst wird (Abbildung 3.6). Die Messung kann an Luft oder in Flüssigkeit erfolgen. Es gibt drei Modi der Oberflächenabtastung: Contact Mode, None Contact Mode und Tapping Mode[®]. Der Contact Mode erlaubt, wie der Name schon vermuten lässt, aufgrund seines Kontakts zur Probe sehr hohe Auflösungen, sogar bis in den atomaren Bereich. Dieser Modus eignet sich jedoch nicht für „weiche“ Proben, da die Möglichkeit der Verformung der Probe durch den Kontakt zur Spitze eine Verfälschung der Ergebnisse zur Folge hätte. Für „weiche“ Proben, wie Liposomen, wird hingegen der Tapping Mode[®] verwendet. In diesem Modus tippt die Spitze nur in einer vordefinierten Frequenz über die Probe. Diese kurze Interaktionszeit zwischen Spitze und Probe minimierte die Verformung der Probe durch entstehende Scherkräfte. Auf diese Weise lässt sich auch die Oberflächenstruktur von weichen Proben darstellen.

10 und 20µl der entsprechenden Proben wurden auf einen Silicium-Chip getropft. Daraufhin wurde die Probe entweder luftgetrocknet oder sofort nach dem Aufbringen das Dispersionsmedium mit einem Kimtech-Tuch (Kimberly-Clark Professional) abgesaugt. Die Messung erfolgte an einem JPK Nanowizard 1 (JPK Instruments AG, Berlin, Germany). Die benutzten Spitzen waren rückseitig mit Aluminium beschichtet und aus Silicium-Nitrit (NSC16 AIBS und NSC14 AIBS, Micromash, Tallinn, Estland). Sie hatten die Form einer Pyramide, eine Resonanzfrequenz von 170kHz, eine Kraftkonstante von 40N/m und eine Länge von 230 µm. Die Bildgröße sowie die Rastergeschwindigkeit wurden entsprechend der Probe gewählt. Die

Messfrequenz bewegte sich zwischen 0,5 und 1Hz. Der verwendete Messmodus war der Tapping Mode[®]. Zur Partikelgrößenbestimmung wurde ein optisches Messverfahren verwendet, welches als Tool (JPK Nanowizard Software) in der Software enthalten ist. Es wurden auf einer Fläche von 1x1µm insgesamt 20 Partikel gezählt und der Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

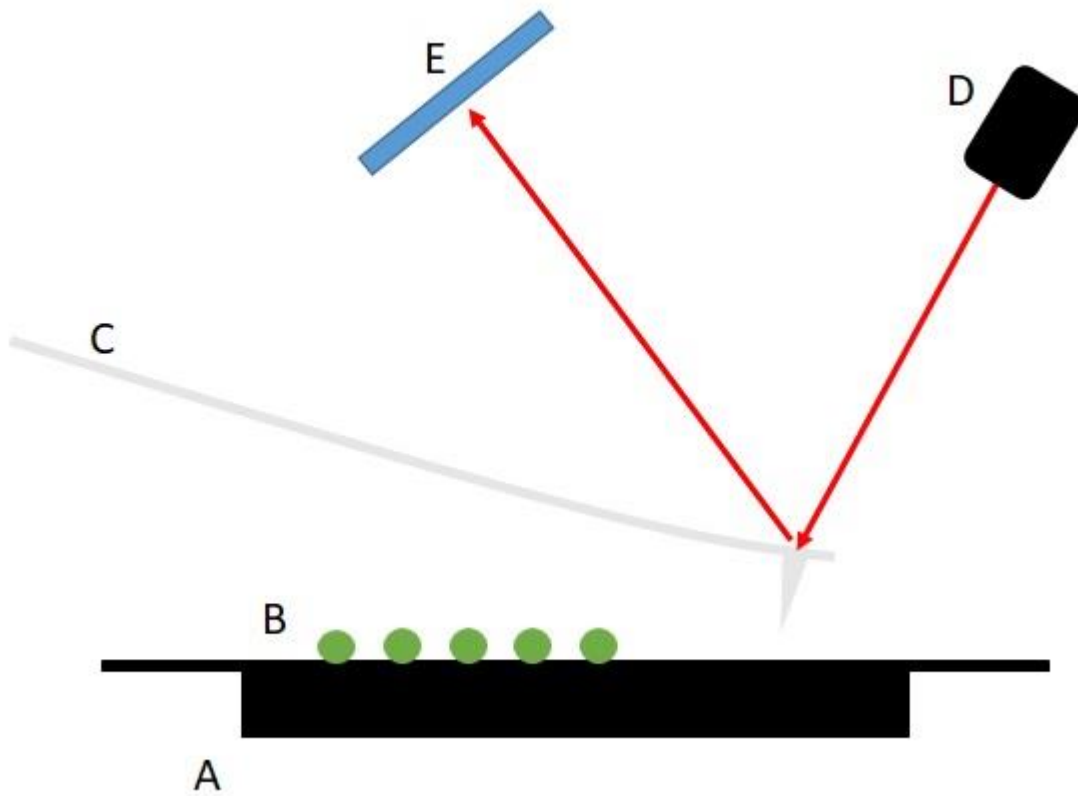


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der AFM Messung. A: Messtisch in XY-Richtung verstellbar; B: zu untersuchende Probe; C: Cantilever; D: Laser; E: Photodetektor.

3.2.4 Dispersionsanalyse

Ein neues Verfahren der Partikelcharakterisierung bietet die Dispersionsanalyse. Grundsätzlich wird bei dieser Methode das Sedimentations- bzw. Aufrahmungsverhalten von dispersen Systemen in einer analytischen Zentrifuge untersucht. Die zu untersuchende Probe wurde in eine Küvette gefüllt und zentrifugiert. Während der Zentrifugation konnte in definierten Zeitabständen die Transmission an mehreren Stellen der Küvette gemessen werden. Die hohe Zentrifugalkraft

erlaubt es, physikalische Stabilitätsuntersuchungen wesentlich schneller und effizienter durchzuführen als bei Erdbeschleunigung. Dieses Prinzip ist in Abbildung 3.7 dargestellt.

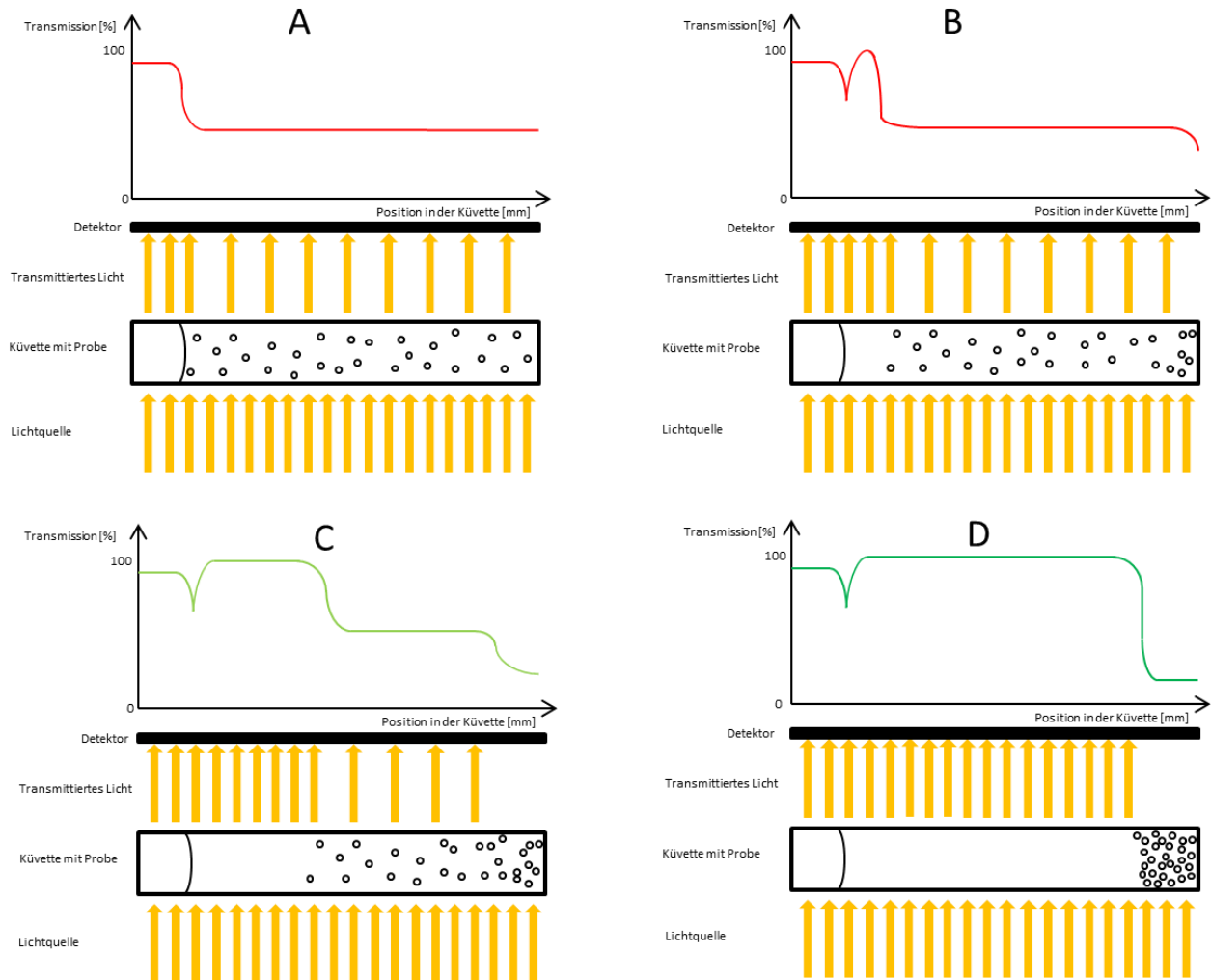


Abbildung 3.7: Messprinzip der Analytischen Zentrifuge. A: Homogen verteilte Probe mit gleichmäßiger Transmission; B: Aufklärung der Probe im oberen Teil der Küvette, anfängliche Sedimentbildung im unteren Teil der Küvette; C: Weiteres Aufklaren der Probe und Vergrößerung des Sediments; D: Vollständig sedimentierte Probe.

Anhand der Aufklärung der Probe ist es möglich die Geschwindigkeit, mit der sich die Partikel im Medium bewegen, zu berechnen. Liegt eine laminare Umströmung und eine sphärische Geometrie der Partikel vor, kann mit Hilfe des Stokeschen Gesetzes auf die Partikelgröße geschlossen werden (Formel 3.3).

$$v_p = \frac{2}{9} * \frac{r^2 * a * (\rho_p - \rho_f)}{\eta} \Leftrightarrow r = \sqrt{\frac{9}{2} * \frac{v_p * \eta}{a * (\rho_p - \rho_f)}} v_p$$

v_p : Sedimentationsgeschwindigkeit des Partikels

r : Radius des Partikels

a : Beschleunigung

ρ_p : Dichte des Partikels

ρ_f : Dichte des Dispersionsmediums

η : Viskosität des Dispersionsmediums

Formel 3.3: Stokesches Gesetz und Umformung zur Radiusberechnung.

Die Dispersionsanalyse wurde mit einem LUMiSizer (LUM GmbH, Berlin, Deutschland) durchgeführt. Zur Probenmessung wurden Polycarbonat Küvetten verwendet, mit einem Durchmesser von 2 mm (110-131xx, LUM GmbH, Berlin, Deutschland). Aufgrund der geringen Absorption der Probe wurde der Lichtfaktor auf den Minimalwert von 0,25 festgelegt. Die Zentrifuge und die Probe wurden auf 25,0°C temperiert und die Umdrehungszahl konstant bei 4000 Umdrehungen pro Minute gehalten, was einer mittleren Beschleunigung von 1954g entspricht. Die Wellenlänge des Lichts betrug 470nm, bei der insgesamt 240 Transmissionsprofile aufgezeichnet wurden. Die Intervalle, nach denen eine Messung erfolgte, betrug zu Beginn der Messung 10 Sekunden und wurde nach jeweils 50 Profilen auf 60, 300 und 600 Sekunden erhöht, abschließend wurden 40 Profile alle 800 Sekunden aufgezeichnet. Die notwendigen Materialdaten für das Dispersionsmedium Wasser waren bereits in der Datenbank des LUMiSizers enthalten, wobei die Viskosität 0,8974mPa*s, die Dichte 997,3 kg/m³, der Realteil des Brechungsindex 1,338 und der Imaginärteil des Brechungsindex 0 betrugen. Für die Tween 80/PBCA Nanopartikel wurde die Dichte auf 1148 kg/m³, der Realteil des Brechungsindex auf 1,456 und der Imaginärteil des Brechungsindex auf 0,001 festgelegt. Der Analysenmodus wurde auf konstante Position eingestellt und als Referenzprofil wurde das letzte Profil der Probe verwendet.

3.3 Stabilitätsstudien der Nanopartikel

3.3.1 Messung der Lagerstabilität

Die Lagerstabilität der Proben konnte mit dem Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Großbritannien) und dem JPK Nanowizard (JPK Instruments AG, Berlin, Deutschland) überprüft werden. Im zweiwöchigen Messzeitraum wurde jeweils am 1, 2, 7 und 14 Tag gemessen. Die Messungen erfolgten analog zu der in 3.2.1 dargestellten Methode. Es wurden drei voneinander unterschiedliche Proben gemessen und der Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

3.4 Herstellung der Nanobubbles

3.4.1 Ultraschallspitze

Die Proben wurden in 20ml Glasfläschchen überführt. Zur Herstellung der Nanobubbles wurde diesmal ein Ultraschallstab (Bandelin Sonoplus GM 3100, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) verwendet. Der Stab wurde etwa 1cm weit in die Probe getaucht. Die Amplitude lag bei 70% und die applizierte Energie betrug 3,478kJ. Da sich im Laufe des Prozesses eine Erhitzung der Probe und des Fläschchens durch die entstehende Energie nicht vermeiden ließ, wurde ein Eisbad während der Herstellung zur Kühlung genutzt. In Abbildung 3.8 ist der Versuchsaufbau dargestellt. Im Anschluss musste der unbehandelten Formulierung die Nanobubbles entnommen werden. Dies geschah aus dem Grenzbereich zwischen sichtbarem Schaum und Flüssigkeit mit Hilfe einer Hamiltonspritze.

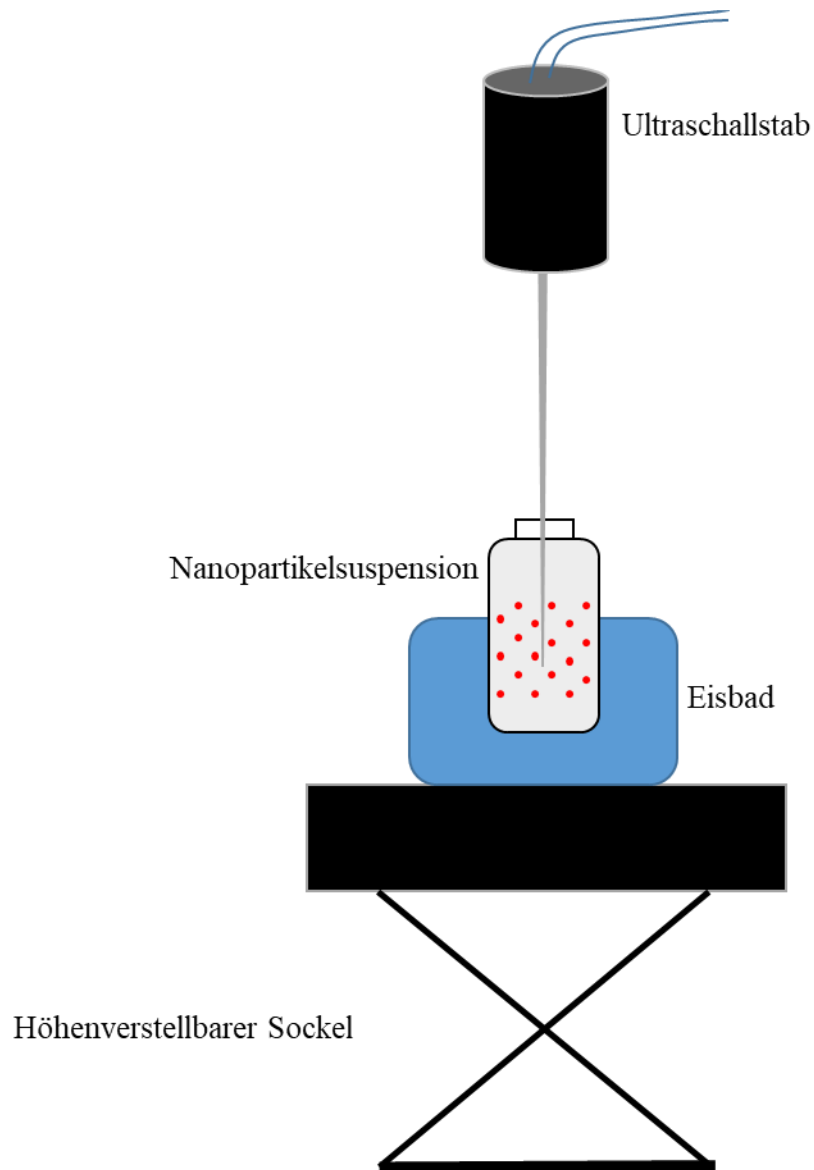


Abbildung 3.8: Versuchsaufbau zur Nanobubbleherstellung. Das Eisbad diente zur Kühlung der Nanosuspension. Die Suspension wurde mit der Höhenverstellung nach oben gefahren, bis die Ultraschallstabspitze in die Suspension hineinragte.

3.5 Charakterisierung der Nanobubbles

3.5.1 Laserdiffraktometrie

Die Charakterisierung des hydrodynamischen Durchmessers der Nanobubbles erfolgte mithilfe des Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Großbritannien). Hierfür wurde das Prinzip der Lichtbeugung genutzt, welches darauf beruht, dass kleine Partikel ein anderes Beugungsmuster des Lichts erzeugen als große. Kleine Partikel haben größere Abstände zwischen den entstehenden Wellenfronten als größere. Der Beugungswinkel (Abstände zwischen den Wellenfronten) ist dabei umgekehrt proportional zur Partikelgröße. Die Berechnung der Partikelgröße erfolgt über die Beugungsmuster, erweist sich jedoch als sehr komplex, wenn die Probe keiner monomodalen Größenverteilung unterliegt. Bei polydispersen Proben überlagern sich die einzelnen Beugungsmuster und erzeugen Interferenzen.

Die Proben waren zuvor, wie unter 3.4.1 beschrieben, hergestellt worden. Mit einer Hamiltonspritze wurde mehrmals die Grenzschicht zwischen dem sichtbaren Schaum und der Flüssigkeit abgezogen und solange in den Probenbehälter (HydroCan) des Mastersizers 3000 gespritzt, bis dieser ein Signallevel von 1-5% erreicht hatte. Der Brechungsindex der Partikel wurde auf 1,456 eingestellt und der des Dispersionsmediums auf 1,330. Der Partikelabsorptionswert betrug 0,010, das Rührwerkzeug hatte eine Geschwindigkeit von 1750rpm und das Streuungsmodell war Mie. Es wurden jeweils drei unterschiedliche Proben vermessen, wobei jede Probe eine Messreihe aus fünf Messungen durchlief.

3.5.2 Rasterkraftmikroskopie

Oberflächenbeschaffenheitsmessungen der Nanobubbles konnten mit dem JPK Nanowizard I durchgeführt werden. Die Vorbereitung der Proben geschah wie unter 3.2.3 beschrieben, ebenso wurden dieselben Parameter, sowie dieselben Spitzen (NSC14 & 16, Micromesh) verwendet.

3.5.3 Rasterelektronenmikroskopie

Das Rasterelektronenmikroskop (REM) Hitachi S-510 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) wurde verwendet, um ein visuelles Bild der Nanobubbles zu erhalten. Bei dieser Methode wird die Probe in einem Hoch-Vakuum (dies soll Wechselwirkungen des Elektronenstrahls, bzw. der Elektronen mit sich in der Kammer befindlichen Ionen oder Molekülen verhindern) von einem gebündelten Elektronenstrahl vermessen. Hierfür rastert der Elektronenstrahl, der von einer Wolframkathode erzeugt wird, die Oberfläche von links nach rechts und von oben nach unten ab. Die Fokussierung des Elektronenstrahls erfolgt mittels eines elektromagnetischen Feldes, welches durch Spulen erzeugt wird. Trifft der Elektronenstrahl auf die Probe, entstehen Wechselwirkungen. Diese führen zu einer Streuung der einfallenden Elektronen und dies zu einer Vielzahl an detektierbaren Signalen. Die Rasterelektronenmikroskopie nutzt die Sekundärelektronen, die Rückstreuelektronen und die charakteristische Röntgenstrahlung zur Bildgebung (Abbildung 3.9).

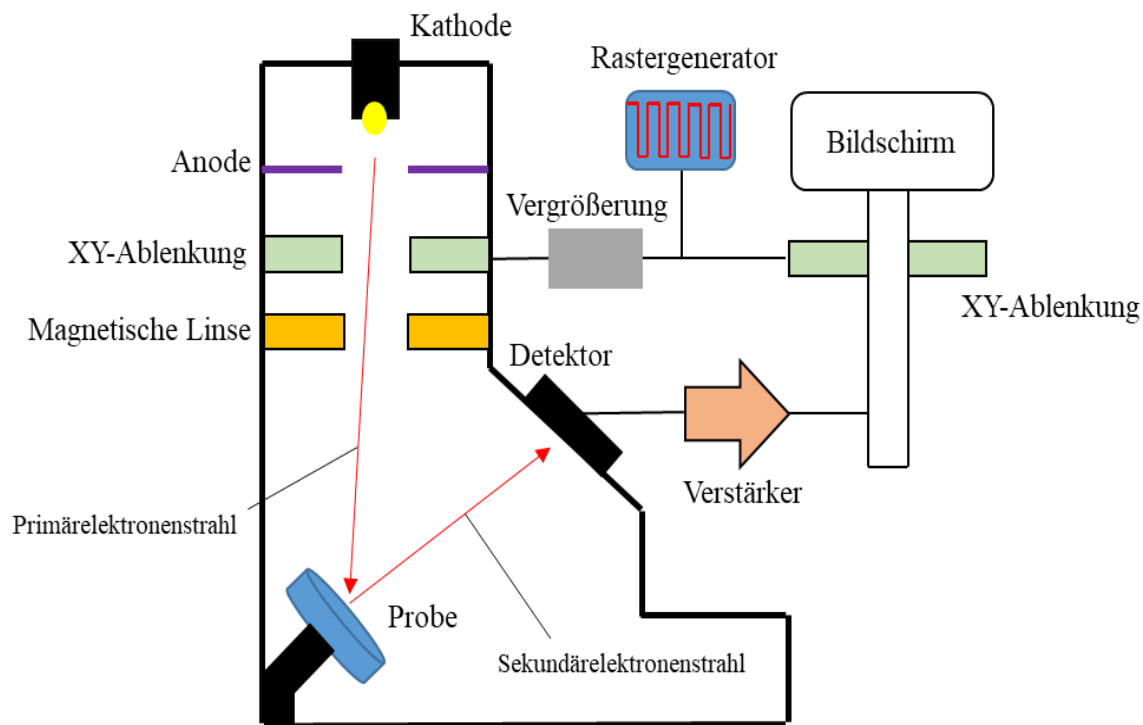


Abbildung 3.9: Schematischer Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops. Der Primärelektronenstrahl, welcher von der Kathode ausgestrahlt wird, trifft auf die Probe und sendet einen Sekundärelektronenstrahl Richtung Detektor. Dabei rastert der Elektronenstrahl die

Probe in einem vorgegebenen Muster ab. Das Signal wird verstärkt und auf den Bildschirm projiziert.

10µl der Grenzfläche zwischen Flüssigkeit und Schaum wurde mit einer Hamiltonspritze abgezogen und auf einen über einen Kohlenstoffträger fixierten Siliziumchip aufgetragen. Eine Probe trocknete unter dem Abzug an der Raumluft, die andere wurde nach dem Aufbringen sofort per Kimtech-Tuch (Kimberly-Clark Professionals) abgezogen. Das Sputtern der präparierten Proben erfolgte im Sputter Coater (Edwards S150 Sputter Coater). Hierbei wird Gold unter Vakuum von $1,3 - 1,4 \times 10^{-4}$ bar und einer Stromstärke von 10 mA auf die Siliziumchipoberfläche aufgebracht. Die aufgetragenen Goldcluster verstärken das Signal der auftreffenden Elektronen und sorgen für eine bessere Bildqualität und Auflösung.

Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, wobei eine einzelne Beschichtung zwischen 20 und 25s dauerte. Vor der Einführung der Proben in den Messraum mussten die Proben auf einer speziellen Halterung fixiert werden, um mögliches Verrutschen (erschwert die Lokalisierung der Proben) zu verhindern. Der eingestellte Arbeitsabstand betrug 15-17,5 mm, die angelegte Spannung 5-15kV bei einer Emission von 30µA und einem Vakuum von 4×10^{-6} bar.

3.5.4 Transmissionselektronenmikroskop

Das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) JEOL 3010, 300 kV (JEOL GmbH, Freising, Germany) wurde verwendet, um die Struktur der Nanobubbles weiter zu untersuchen. Nach Helmholtz ist der Abstand zweier selbstleuchtender Objektpunkte nach folgender Beziehung (Formel 3.4) definiert.

$$d_{min} = 0,6 \frac{\lambda}{n * \sin \alpha}$$

d_{min} : Auflösungsgrenze

λ : Wellenlänge

α : halbe Öffnungsweite des Objektivs

n : Brechungsindex des Mediums

Formel 3.4: Beziehung nach Helmholtz zum Abstand zweier selbstleuchtender Objektpunkte.

Für ein Lichtmikroskop liegt d_{min} bei 200nm. Mittels Transmissionselektronenmikroskopie (Abbildung 3.10) lassen sich subatomare Auflösungen erreichen. Die von einer Kathode emittierten Elektronen werden im Hochvakuum mit einer Spannung von 300kV beschleunigt und über Kondensorlinsen auf die Probe gerichtet. Die Probe wird, anders als in der Rasterelektronenmikroskopie, durchstrahlt. So können der Energieverlust des Primärelektrons oder die elastisch gestreuten Sekundärelektronen zur Bildgebung genutzt werden. Dies erfordert im Umkehrschluss eine genaue Vorbereitung der Proben. Die Herstellung der Nanobubbles geschah wie in 3.4.3 beschrieben. Diese wurden daraufhin auf Kohlenstoff beschichtete Grids getropft und das Dispersionsmedium nach kurzer Zeit mit einem Kimtech-Tuch (Kimberly-Clark Professionals) abgezogen. Um die Probe zu färben wurde ein Tropfen 2%ige Uranylacetatlösung auf den Grid gesetzt und nach 5min mit einem Kimtech-Tuch (Kimberly-Clark Professionals) abgezogen. Die an einer speziellen Haltung befestigte Probe konnte daraufhin in das Mikroskop eingeführt werden. Es wurde bei einer Stromstärke von 300kV, einer Emission von 100 μ A und einer Stromdichte von 50-60 pA/cm³ gemessen.

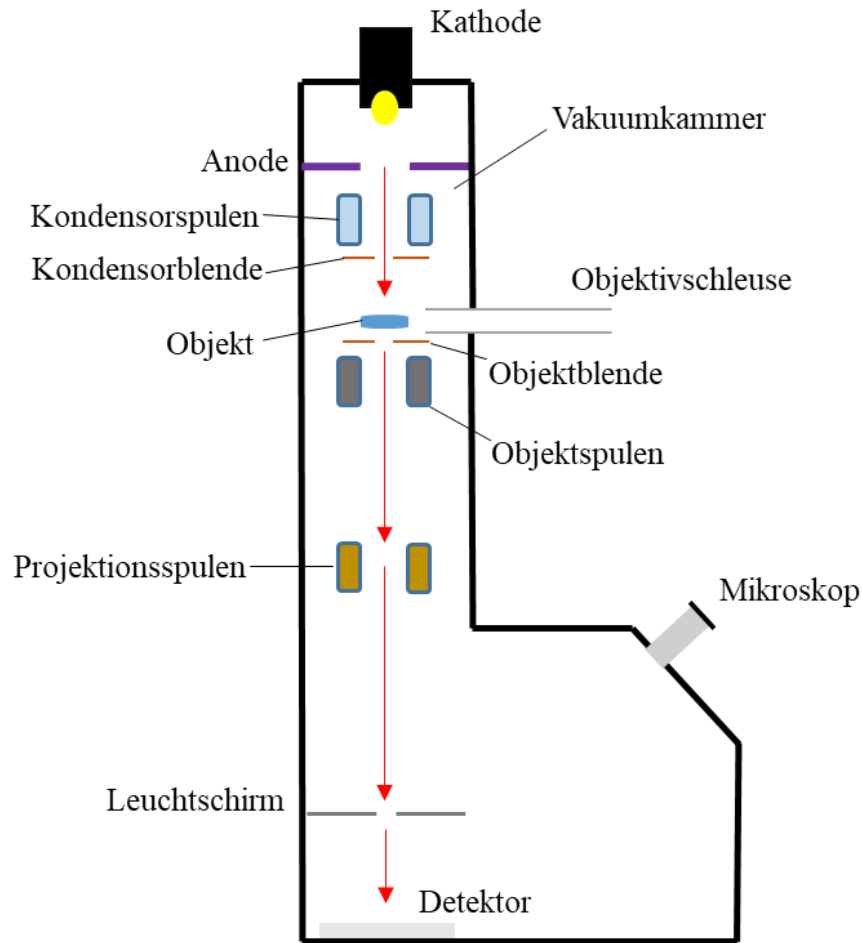


Abbildung 3.10: Schematischer Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops. Der Elektronenstrahl, welcher von der Kathode generiert wird, durchquert die Vakuummkammer. Er passiert Kondensatorspulen und –blende und trifft auf das zu untersuchende Objekt, welches durch die Schleuse eingeführt werden kann. Der Strahl durchstrahlt anders, als beim Rasterelektronenmikroskop, die Probe. Über eine weitere Blende, die Objektspule, die Projektionsspule und den Leuchtschirm trifft der Elektronenstrahl auf den Detektor. Das entstandene Bild kann über ein Mikroskop betrachtet werden.

3.5.5 Lichtmikroskopie

Das Polarisationsmikroskop Olympus Bx53 (Olympus Europa SE & CO. KG, Hamburg, Deutschland) wurde verwendet, um eine abschließende visuelle Analyse der Nanobubbles durchzuführen. Die Herstellung erfolgte analog zu 3.4.1, wobei das Interesse wieder der Grenzfläche zwischen der Flüssigkeit und der Schaumschicht galt. Nach Auftragen von 2 μ l der Probe auf einen Objektträger fixierte ein Deckglas den Tropfen, auf das daraufhin ein Tropfen

Immersionsöl aufgebracht wurde. Die Größe (sichtbarer geometrischer Durchmesser) von 100 Nanobubbles wurde manuell erfasst und der Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

3.6 Stabilitätsstudien der Nanobubbles

3.6.1 Messung der Stabilität

Die Stabilität der Nanobubbles wurde mit Hilfe des Mastersizer 3000 erfasst. Die Bubblesherstellung geschah analog zu 3.4.1 und anschließend wurden die Nanobubbles direkt in den Probenbehälter des Mastersizers 3000 gegeben. Die Rührgeschwindigkeit betrug 1750rpm und das Signallevel 1-5%. Folgende Parameter waren eingestellt: Partikelabsorptionswert: 0,01; Brechungsindex: 1,456; Brechungsindex des Mediums: 1,330; Die Messung hatte fünf Wiederholungen und wurde nach 10min mit einer Rührgeschwindigkeit von 3200rpm wiederholt. Die Berechnung der Größe erfolgte über die von Malvern bereitgestellte Software.

3.6.2 Einfluss von Natriumchlorid

Der Einfluss der Natriumchloridkonzentration, im umgebendem Medium, auf die Stabilität der Nanobubbles wurde daraufhin untersucht. Hierfür wurden die Nanopartikel wie unter 3.1.1 und 3.1.3 beschrieben hergestellt und daraufhin den Lösungen NaCl in bestimmten Konzentrationen zugesetzt. Die entstandenen Lösungen hatten NaCl-Konzentrationen von 1; 0,1; und 0,01mol/l.

Die Nanopartikel konnten daraufhin wie unter 3.4.1 beschrieben weiter zu Nanobubbles verarbeitet werden. Die Verwendung des Mastersizers, d.h. der Laserdiffraktometrie, ermöglichte im Anschluss die Vermessung des Durchmessers. Versuchsdurchführung, Messparameter, so wie Messauswertung und Analyse entsprachen der unter 3.6.1. beschriebenen.

3.7 Untersuchung der Echogenizität

3.7.1 Messung der Ultraschallverstärkung

Die Messung der Ultraschallkontrastverstärkung erfolgte in einem selbst entwickeltem Modell (Abbildung 3.11). Hierfür diente das bereits etablierten Systems von Brüßler et. al und Kollmann et. al [133] als Basis. Jedoch war der Fokus der Messung auf die Kontrastverstärkung der applizierten Probe gelegt. Das Modell bestand kurz zusammengefasst aus einem mit Agar-Gel gefülltem 2,5l Becherglas aus Kunststoff. Durch dieses Agar gefüllte Becherglas zog sich ein Silikonschlauch, welcher in einem Winkel von 30° zum Boden lag. Eine Peristaltikpumpe simulierte den menschlichen Blutdruck. Dabei ähnelte der eingestellte Peristaltikpumpendruck dem Normaldruck des menschlichen Körpers. Die verwendete Ultraschallsonde wurde in ein Ultraschallgel eingetaucht und mit einem Stativ fixiert und der Ultraschallkopf so ausgerichtet, dass im Bild möglichst die gesamte Breite des Schlauches erfasst werden konnte. Ein Becherglas wurde an das System angeschlossen, die Peristaltikpumpe gestartet und gegebenenfalls die sich im Schlauch befindlichen Luftblasen entfernt. Es wurden jeweils 100 μ l Probe, die wie in 3.4.1 hergestellt wurde, über einen Zeitraum von 2min untersucht und mit einer Probe von SonoVue[®] verglichen. Dabei war die Ultraschallverstärkung durch einen Anstieg des Grauwerts im Inneren des Schlauches gekennzeichnet. Dieser Anstieg der Grauwerte wurde mit dem kommerziell erhältlichen SonoVue[®] verglichen und mit ImageJ ausgewertet. Das verwendete Ultraschallgerät war das eZono 3000 (eZono AG, Jena, Deutschland).

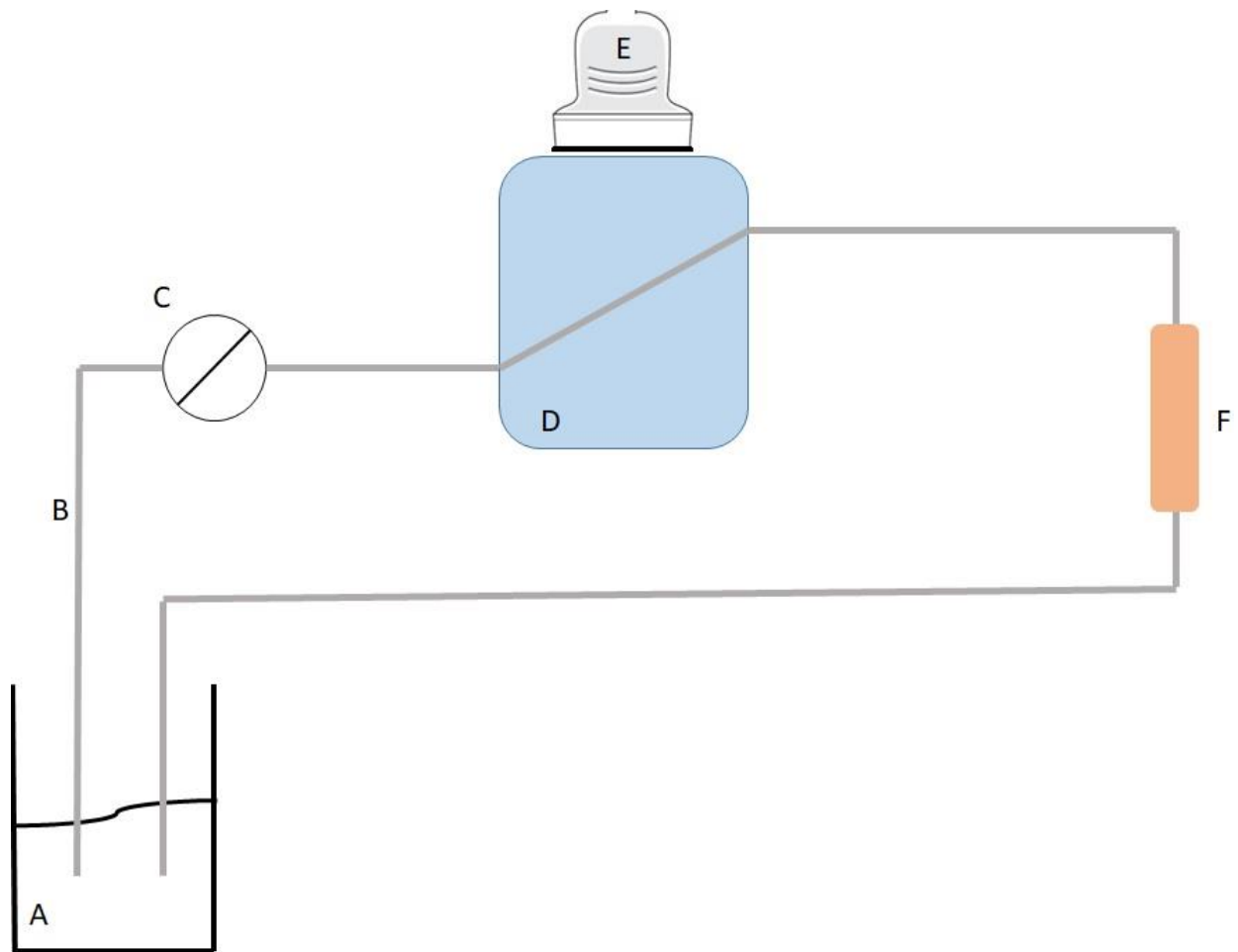


Abbildung 3.11: Schematischer Aufbau der Kontrastverstärkungsmessung. A: Becherglas mit Probe; B: Schlauchsystem; C: Peristaltikpumpe; D: Agar-Gelblock; E: Schallsonde; F: Manometer.

3.8 Biokompatibilität

3.8.1 Chorioallantois-Membran-Modell

Um die Biokompatibilität des verwendeten Polymers (PBCA), sowie des Tensids (Tween 80) zu testen, konnte das Chorioallantois-Membran-Modell (CAM-Model) herangezogen werden. Befruchtete Hühnereier wurden 4 Tage bei 37,8°C und 60% relativer Feuchte in einem Kleinmotorbrüter mit automatischer Wendevorrichtung und automatischer Befeuchtungsregulierung (Typ KMB 6, W. Ehret, Germany) bebrütet und dabei innerhalb von 24 Stunden 6 mal gedreht, um einem Anwachsen des Embryos an der Eierschale vorzubeugen. Am vierten Tag der embryonalen Entwicklung wurden die bebrüteten Hühnereier unter Zuhilfenahme eines pneumatischen EggPuncher bei einem Druck von 2-3bar an der apikalen Seite unter aseptischen Bedingungen geöffnet und anschließend bis zum Versuchsbeginn unter konstanten Bedingungen weiter bebrütet.

Am sogenannten Egg development day (EDD, Entwicklungstag) 10 wurden zehn Eier für den Versuch herangezogen. Zunächst erfolgte eine Untersuchung des Gesundheitszustandes der ausgesuchten Eier unter einem Stereolichtmikroskop bei 13-facher Vergrößerung (Stemi 2000-C, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Germany). Die Beschaffenheit der Blutgefäße in der Chorioallantois-Membran, sowie die Anwesenheit eines kräftigen Herzschlages und die Agilität des Kükens waren hierfür ausschlaggebende Parameter.

Die Herstellung der Proben geschah, wie unter 3.1.2 und 3.1.3 beschrieben, die anschließende Fraktionierung, wie unter 3.1.4 beschrieben.

Für die intravenöse Applikation wurden, unter Zuhilfenahme von speziell für diese Zwecke hergestellten Nadeln aus Glaskapillaren (Glass Replacement 3.5 nanoliters, World Precision Instruments, Sarasota, USA), Infusionsbesteck (Venofix, B Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), sowie einer Insulinspritze (B Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) unter dem Stereolichtmikroskop bei 25-facher Vergrößerung 50µl der Probe injiziert. Alle verwendeten Materialien waren vor der Nutzung mit 70%igem Isopropanol desinfiziert worden. Die weitere Bebrütung für 6 Tage erfolgte unter konstanten Bedingungen bei 37,8°C und 60% relativer Feuchte. An EDD 16 wurde die abschließende Überlebensrate, unter Heranziehen der gleichen Parameter wie zuvor bei der Gesundheitsuntersuchung, ermittelt.

3.8.2 Zellkultur

Zusätzlich konnte die Zytotoxizität der Tween 80/PBCA Nanopartikel anhand des MTT-Assays unter Verwendung von Thiazoylblautetrazoliumbromid untersucht werden. L929-Zellen wurden mit einer Dichte von 10000 Zellen pro Well auf 96-Well-Platten ausgesät. Die Tween 80/PBCA Nanopartikel wurden nach 3.1.2 und 3.1.3 hergestellt und wie in 3.1.4 beschrieben weiterverarbeitet. Eine 4%ige Tween 80 Formulierung war die Referenz für die mögliche Toxizität von PBCA und/oder Tween 80. Als Positivkontrolle diente 0,1% Triton X-100 und als Negativkontrolle wurden unbehandelte Zellen (Blank) genutzt. Danach folgte Inkubieren und nach weiteren 4h die Zugabe von zusätzlichen Medium in die Wellplattenvertiefungen und ein weiteres Inkubieren für 48h. Nach dieser Zeit wurden die Platten zwei Mal mit calcium- und magnesiumhaltigen PBS Puffer (pH 7,4) gewaschen und erneut mit Medium, welches das MTT-Assay Reagenz enthielt, gefüllt. Die Reaktion des MTT-Assay Reagenzes (Abbildung 3.12) vollzieht sich während weiterer 4h Inkubationszeit. Dabei metabolisieren die lebensfähigen Zellen den MTT-Farbstoff und reduzieren ihn. Das verbleibende Medium wurde abgesaugt und 200µl Dimethylsulfoxid-Lösung hinzugefügt, um die Probe aus der Well-Platte zu lösen. Mit dem FLUOstar™ Optima Plattenleser (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) konnte die Probe im Anschluss bei 570nm ausgewertet werden.

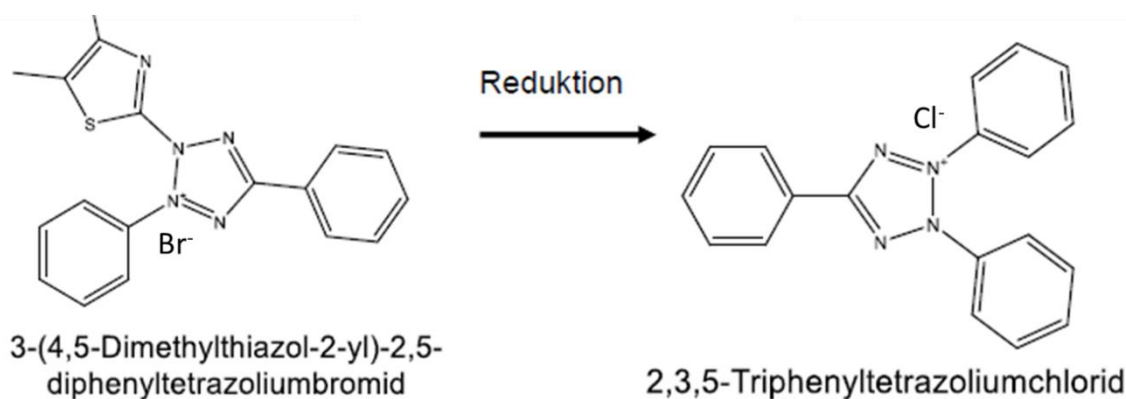


Abbildung 3.12: Farbreaktion des MTT-Reagenzes zu einem schwer löslichen Salz, dem Formazan. Das Formazan kann nach Gewinnung photometrisch analysiert werden, um so einen Rückschluss auf die Überlebensrate der Zellen zu bekommen, da die Reaktion von den Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH abhängt.

4 Ergebnisse

4.1 Nanopartikel

4.1.1 Zentrifugation und Filtration der Nanosuspension

Die Nanopartikelsuspensionen enthielten nach Polymerisation im Reaktor außer Nanopartikeln, durch die Polymerisationsart bedingt auch sehr große, die Messung behindernde Agglomerate. Damit im Anschluss Größenmessungen stattfinden konnten, mussten die Nanopartikel nach Herstellung durch Filtrierung und Zentrifugation aufgereinigt werden, sodass alle untersuchten Lösungen Partikel von unter $0,22\mu\text{m}$ enthielten. Dies ist schematisch in Abbildung 4.1 dargestellt.

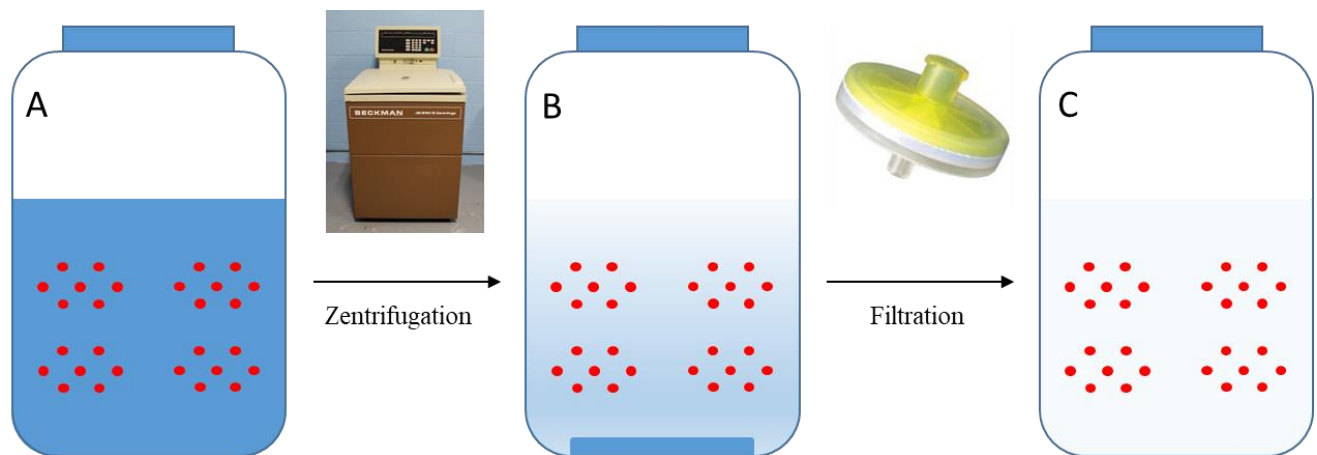


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Aufreinigung der Nanopartikel (rote Punkte). A: Vor der Zentrifugation sind die Nanopartikel in Lösung von großen Polymerketten und Agglomeraten (blaue Lösung) umgeben; B: Durch die Zentrifugation konnten die großen Polymerketten von den Nanopartikeln getrennt werden und sind als Bodensatz im Zentrifugiergefäß erkennbar. Jetzt sollten nur noch Nano- und Mikropartikel in Lösung sein; C: Die anschließende Filtration reinigt die Partikel weiter auf. Die übrigen Partikel haben einen Durchmesser von $\leq 0,22\mu\text{m}$.

4.1.2 Vergleich der beiden Tenside und Rührapparaturen

Beide Tenside wurden anhand des hydrodynamischen Durchmessers der entstandenen Nanopartikel verglichen. Die Tensidlösungen wurden, wie in 3.1.1 und 3.1.2 beschrieben, hergestellt und anschließend in den, unter 3.1.3 beschriebenen und auf 2°C herunter gekühlten Reaktor überführt. Als Rührwerkzeuge des Reaktors konnten entweder ein Propeller oder Lamellen benutzt werden. Die Rührgeschwindigkeiten betrugen jeweils 250rpm.

Die Größen der entstandenen Polybutyrylcyanoacrylat-Nanopartikel unterschieden sich abhängig von dem eingesetzten Tensid, sowie von dem verwendeten Rührwerkzeug. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Mit dem Propeller konnte für die 0,5%ige Triton X-100 Formulierung eine Größe von $21,33\text{nm} \pm 1,6\text{nm}$ ermittelt werden, für 1% Triton X-100 wurde eine Größe von $25,81\text{nm} \pm 4,96\text{nm}$ gemessen und mit 2% Triton X-100 betrug die Größe der Nanopartikel $18,64\text{nm} \pm 3,70\text{nm}$. Der Austausch des Tensids führte zu $13,36\text{nm} \pm 1,22\text{nm}$ für 1% Tween 80 bei der Herstellung mit dem Propeller, die 2%ige Tween 80 Formulierung ergab $11,3\text{nm} \pm 0,77\text{nm}$, bei 3% und 4% Tween 80 hatten die Nanopartikel einen Durchmesser von $12,67\text{nm} \pm 1,87\text{nm}$ bzw. $12,81\text{nm} \pm 1,40\text{nm}$. Alle Formulierungen zeigten eine multimodale Verteilung, was an dem PDI erkennbar ist, der sich in einem weiten Bereich zwischen 0,2 und 0,6 bewegte.

Nach Ändern des Rührwerkzeugs wurde für die 0,5%ige Triton X-100 Formulierung eine Größe von $11,13\text{nm} \pm 0,47\text{nm}$, für die 1% Triton X-100 $14,04\text{nm} \pm 1,73\text{nm}$ und für die Formulierung mit 2% Triton X-100 eine Größe von $11,01\text{nm} \pm 0,69\text{nm}$ ermittelt. Für 1% Tween 80 Formulierung wurden hingegen nur $8,12\text{nm} \pm 0,1\text{nm}$ gemessen, die 2% und 3% Tween 80 Formulierungen waren mit $8,00\text{nm} \pm 0,11\text{nm}$ und $8,02\text{nm} \pm 0,31\text{nm}$ fast gleich groß, während für die 4%ige Tween 80 Formulierung $9,46\text{nm} \pm 0,29\text{nm}$ ermittelt wurden. Der PDI der Formulierungen lag diesmal zwischen 0,3 und 0,8, was wiederum auf eine multimodale Verteilung hinweist.

Tabelle 4.1: Größe und PDI der entstandenen Nanopartikel mit unterschiedlichen Tensidkonzentrationen, sowie unterschiedlichen Herstellungsmethoden ermittelt mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung.

	Herstellung mit Propellerschrauben	
Tensidkonzentration	Durchmesser [nm]	PDI
0,5% Triton X-100	21,33±1,60	0,504
1% Triton X-100	25,81±4,96	0,440
2% Triton X-100	18,64±3,70	0,555
1% Tween 80	13,49±1,22	0,255
2% Tween 80	11,30±0,77	0,510
3% Tween 80	12,67±1,87	0,336
4% Tween 80	12,81±1,40	0,285
	Herstellung mit Lammellen	
Tensidkonzentration	Durchmesser [nm]	PDI
0,5% Triton X-100	11,30±0,47	0,323
1% Triton X-100	14,04±1,73	0,392
2% Triton X-100	11,01±0,47	0,358
1% Tween 80	8,12±0,10	0,838
2% Tween 80	8,00±0,11	0,344
3% Tween 80	8,02±0,31	0,368
4% Tween 80	9,46±0,29	0,609

4.1.3 Nachfolgende Lagerung

Die Stabilität der Nanopartikel wurde überprüft, indem die Partikel in einer 0,1% Tween 80 Lösung überführt und anschließend am 1., 2., 7. und 14. Tag mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung vermessen wurden. Nur die Stabilität der mit Tween 80 hergestellten Nanopartikel wurde überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2 und Abbildung 4.3 zusammengefasst. Für 1% Tween 80 nahm die Größe um 0,64nm zu. Für 2% Tween 80 waren es 0,47nm, bei Zusatz von 3% Tween 80 betrug die Zunahme 0,92nm und die Nanopartikel mit 4% Tween 80 wuchsen um 1,42nm. Der PDI änderte sich bei allen Lösungen über die Zeit und stieg beinahe überall auf 1,000.

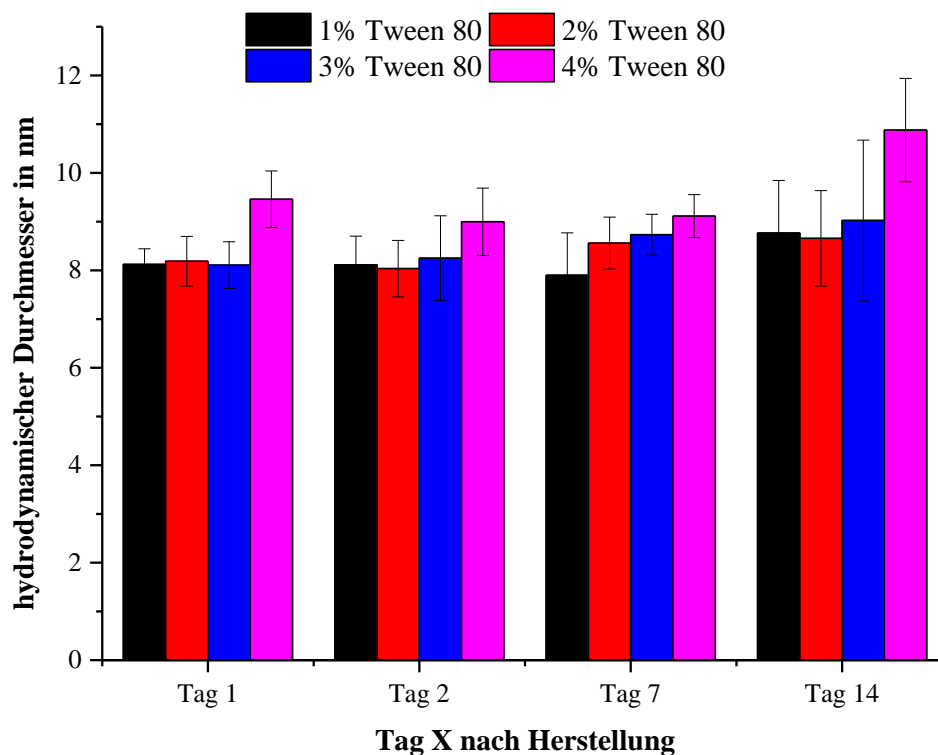


Abbildung 4.2: Gemessener hydrodynamischer Durchmesser der Tween 80 Nanopartikel Formulierungen nach bestimmter Lagerdauer. Den geringsten Größenzuwachs verzeichneten die 1%ige und die 2%ige Formulierungen. Die 4%ige Tween 80 Formulierung erfuhr die größte Zunahme über 14 Tage, sodass die Partikel im Mittel $10,89\text{nm} \pm 1,65\text{nm}$ groß waren.

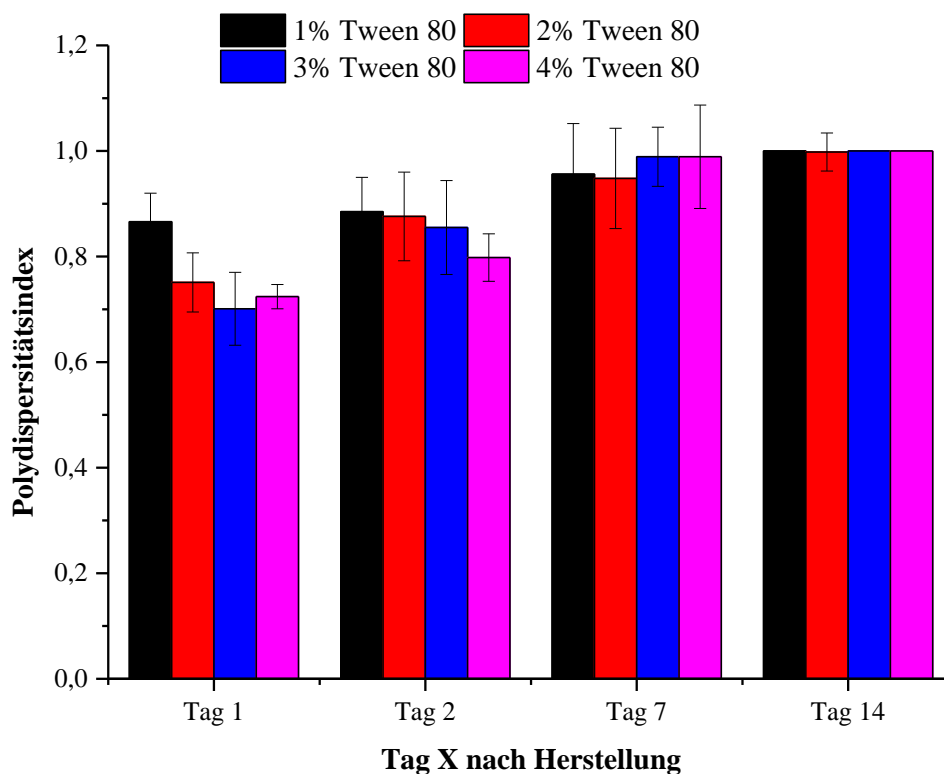


Abbildung 4.3: Gemessener Polydispersitätsindex (PDI) der Tween 80 Formulierungen nach bestimmter Lagerdauer. Mit zunehmender Lagerdauer stieg der PDI aller Formulierungen und näherte sich 1 oder ist gleich 1.

4.1.4 Nachfolgende Lyophilisation

Durch Lyophilisation lässt sich die Lagerstabilität nochmals deutlich erhöhen. Partikel mit 1% Triton X-100 und Partikel mit 2% Tween 80 als Tensid wurden ohne Zugabe eines Kryoprotektants gefriergetrocknet, die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Für beiden Proben konnte eine Abnahme in der Größe beobachtet werden. Die Größe der 1% Triton X-100 Partikel schrumpfte um $2,25\text{nm} \pm 1,99\text{nm}$, während die 2% Tween 80 Partikel um $0,56\text{nm} \pm 0,33\text{nm}$ schrumpften. Jedoch stieg der PDI stark an und war für mehrere Chargen gleich 1,000 und deutete somit auf eine extreme Breite der Partikelgrößenverteilung hin.

Tabelle 4.2: Größe und PDI nach Lyophilisation ohne Zugabe eines Kryoprotektants, ermittelt mit Hilfe der dynamischer Lichtstreuung.

Surfactantkonzentration	Durchmesser [nm]	PDI
1 % Triton-X 100	11,79±3,43	1,000
2 % Tween 80	7,44±0,03	0,647

4.1.5 Einfluss des NaCl-Zusatzes auf Durchmesser und Zetapotential

Ein Einfluss der Zugabe von NaCl auf die Größe und den PDI der Nanopartikel wurde anhand von DLS überprüft. Die Partikel wurden, wie unter 3.1.1.- 3.1.3 beschrieben, hergestellt und dann wie unter 3.6.2 weiterverarbeitet. In Tabelle 4.3 ist der hydrodynamische Durchmesser, sowie der PDI der Partikel mit NaCl-Ionen, welcher mittels dynamischer Lichtstreuung erfasst wurde, zusammengefasst. Nach Zugabe von 0,01mol/l NaCl ergaben sich für die 1%ige Tween 80 Formulierung ein Durchmesser von 8,16nm±0,47nm, sowie ein PDI von 0,784. Bei den anderen Formulierungen (2% - 8,07nm±0,67nm; 3% - 8,95nm±0,67nm und 4% - 8,65nm±0,66nm) änderte sich an der gemessenen Größe bei 0,01mol/l NaCl ebenfalls wenig. Jedoch stieg der PDI, je nach Formulierung, auf 0,6-0,8. Durch Zugabe von 0,1mol/l NaCl konnten ebenfalls kaum Änderungen des Durchmessers beobachtet werden. Die 1%ige Tween 80 Formulierung wies einen Durchmesser von 7,88nm±0,65nm, die 2%ige einen von 8,25nm±0,14nm, die 3%ige einen von 9,23nm±0,96nm und die 4%ige zum Schluss einen von 9,22nm±0,81nm auf. Der PDI stieg bei dieser NaCl-Konzentration ebenfalls leicht und lag zwischen 0,6 und 0,8. Durch die Zugabe von 1mol/l NaCl, konnte eine Vergrößerung der Partikel beobachtet werden. Zudem war die Standardabweichung des Durchmessers der Partikel bei 1mol/l NaCl am höchsten. Für die 1%igen Tween 80 Partikel konnten Durchmesser von 9,44nm±1,99nm (PDI: 0,901), für die 2%igen von 9,68nm±1,2nm (PDI: 0,910), für die 3%igen von 10,23nm±1,56nm (PDI: 0,850) und für die 4%igen von 13,26nm±1,87nm (PDI: 1,000) gemessen werden. Zu erwähnen ist zusätzlich die starke Zunahme des PDI bei allen Proben für die höchste NaCl-Konzentration.

Tabelle 4.3: Einfluss der Zugabe von NaCl-Ionen auf den hydrodynamischen Durchmesser und den PDI der Nanopartikel mit unterschiedlichen Tensidkonzentrationen.

Tensidkonzentration	NaCl-Konzentration [mol/l]	Durchmesser [nm]	PDI
1%Tween 80	0,01	8,16±0,47	0,784
	0,10	7,88±0,65	0,785
	1,00	9,44±1,99	0,901
2%Tween 80	0,01	8,07±0,67	0,810
	0,10	8,25±0,14	0,748
	1,00	9,68±1,20	0,910
3%Tween 80	0,01	8,95±0,77	0,623
	0,10	9,23±0,96	0,785
	1,00	10,23±1,56	0,850
4%Tween 80	0,01	8,65±0,66	0,853
	0,10	9,23±1,54	0,741
	1,00	13,26±2,23	1,000

In Abbildung 4.4 sind die Ergebnisse der Messung des Zetapotentials dargestellt. Aufgeführt ist das Zetapotential für die Nanopartikel direkt nach Herstellung, welches für die 1%ige Tween 80 Formulierung bei $-7,42\text{mV} \pm 1,73\text{mV}$ lag, für die 2%ige und die 3%ige Formulierung wurden Potentiale von $-6,32\text{mV} \pm 2,93\text{ mV}$ bzw. $7,70\text{mV} \pm 3,69\text{ mV}$ gemessen. Das Zetapotential der 4%igen Tween 80 erreichte $-7,78\text{mV} \pm 2,73\text{ mV}$. Nach Zugabe von $0,01\text{mol/l}$ NaCl sanken alle Zetapotentiale ab, sodass für die 1%ige Formulierung $-9,45\text{mV} \pm 3,69\text{ mV}$ gemessen wurden. Die 2%ige Partikelformulierung erreichte das niedrigste Zetapotential mit $-12,84\text{mV} \pm 2,79\text{ mV}$. Die Änderungen waren bei den restlichen zwei Formulierungen, 3% und 4% Tensid bei $-8,18\text{mV} \pm 2,28\text{ mV}$ bzw. bei $-9,13\text{mV} \pm 2,73\text{mV}$.

Bei einem Zusatz von $0,1\text{mol/l}$ NaCl wiederum konnte ein Anstieg des Zetapotentials für alle Tensidkonzentrationen beobachtet werden. Für 1% Tween als Tensid stieg das Zetapotential auf $-6,48\text{mV} \pm 1,22\text{ mV}$, für 2% Tween auf $-5,38\text{mV} \pm 2,73\text{mV}$ und für 3% Tween auf $-6,74 \pm 2,03$

mV. Die 4%ige Tween 80 Formulierung hatte mit 0,1mol/l NaCl immer noch ein Zetapotential von $-8,45\text{mV} \pm 1,45\text{ mV}$.

Der Trend des steigenden Zetapotentials mit steigender NaCl-Konzentration konnte weiter beobachtet werden. Durch Zugabe von 1mol/l NaCl konnte für alle Formulierungen ein Zetapotential zwischen $-1,5\text{mV}$ und 0mV ermittelt werden. Die 1%ige Tween 80 Formulierung wies ein Potential von $-1,03\text{mV} \pm 0,88\text{mV}$ auf. Die 2%ige Formulierung hatte $-1,24\text{mV} \pm 0,69\text{mV}$ als Potential, bzw. die 3%ige Tween 80 Formulierung $-0,25\text{mV} \pm 0,25\text{mV}$. Für die 4%ige Formulierung konnte $-0,81\text{mV} \pm 1,13\text{mV}$ ermittelt werden, wobei diese als einzige positive Zetapotential aufwies.

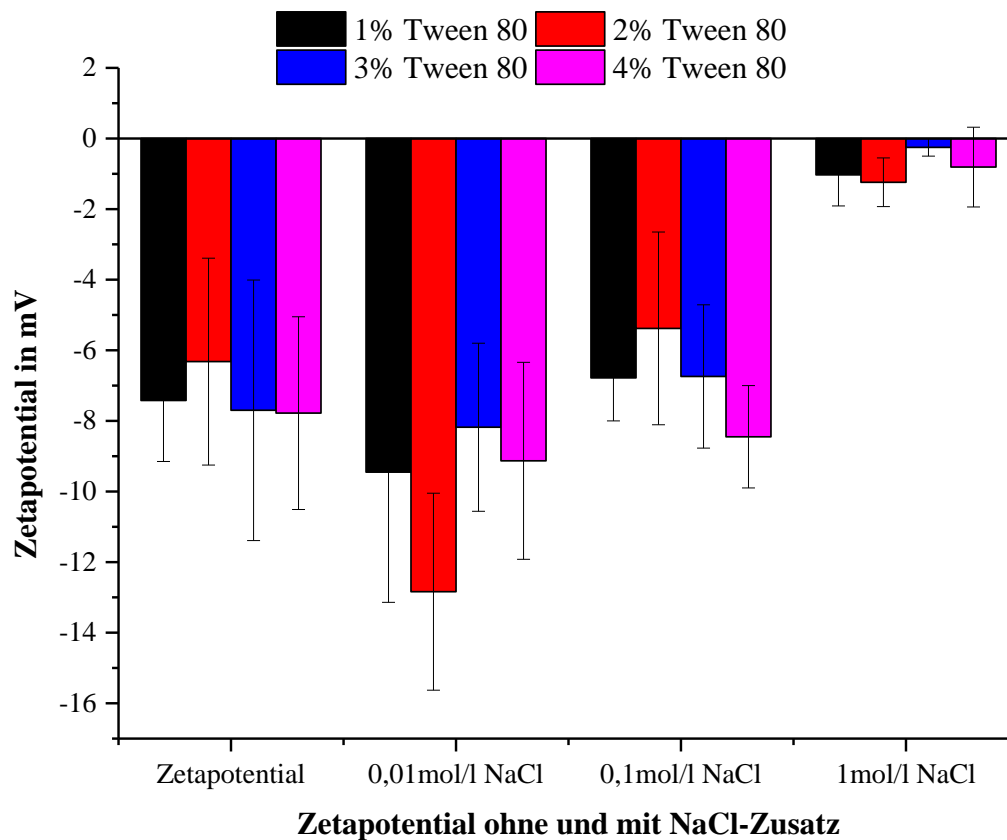


Abbildung 4.4: Messung des Zetapotentials durch Laser-Doppler-Anemometrie. Nach Zugabe von 0,01mol/l NaCl sinkt das Zetapotential bei allen Formulierungen ab, weiterer Zusatz lässt das Zetapotential wieder steigen, sodass es bei 1mol/l NaCl beinahe $\pm 0\text{mV}$ erreicht.

4.1.6 Größenanalyse mittels Rasterkraftmikroskopie

Eine der besten Methoden zur Visualisierung kleinster Strukturen, wie Nanopartikeln, bietet die Rasterkraftmikroskopie. Zudem können gleichzeitig die Größenergebnisse der dynamischen Lichtstreuung überprüft werden, da mit dem AFM auch der Durchmesser ermittelt werden kann. Die Partikel wurden nach 3.1.2 und 3.1.3 hergestellt und anschließend wie unter 3.2.3 beschrieben vermessen. Der ermittelte mittlere Durchmesser von 50 Partikeln mit Standardabweichung ist in Tabelle 4.3 aufgeführt. Für die 1%igen Tween 80 Partikel wurde eine mittlere Größe von $40,01\text{nm} \pm 12,15\text{nm}$ gemessen, wohin gegen die 2%igen Tween 80 Partikel nur eine mittlere Größe von $25,3\text{nm} \pm 6,01\text{nm}$ aufwiesen. Die 3%igen Partikel waren im Mittel $33,95\text{nm} \pm 8,75\text{nm}$ groß und bei 4% Tween 80 nahm der Durchmesser auf $50\text{nm} \pm 8,86\text{nm}$ zu. Die Proben zeigten mehrere Partikelpopulationen, worauf schon der hohe PDI der vorhergehenden Messung der dynamischen Lichtstreuung hindeutete. Jedoch ließen sich die größeren Strukturen leicht als Agglomerate charakterisieren, was in den folgenden AFM Bilder deutlich sichtbar ist (Abbildung 4.2) und eine Größenauswertung erleichterte. Alle gemessenen Werte waren im Vergleich zu den Werten der dynamischen Lichtstreuung deutlich höher.

Tabelle 4.4: Mittlere Größe und dazugehörige Standardabweichung ermittelt, an jeweils 50 Partikeln mit unterschiedlichen Tensidkonzentrationen.

Tensidkonzentration	Durchmesser [nm]	Standardabweichung
1% Tween 80	40,01	$\pm 12,15$
2% Tween 80	25,30	$\pm 6,01$
3% Tween 80	33,95	$\pm 8,75$
4% Tween 80	50,00	$\pm 8,86$

4.1.7 Analytische Zentrifuge

Mit der Dispersionsanalyse, welche mit einer analytischen Zentrifuge durchgeführt wird, lässt sich ebenfalls der Durchmesser der Partikel evaluieren. Die Proben wurden wie in 3.2.4 beschrieben vorbereitet und anschließend anhand der folgenden Transmissionsprofile interpretiert. Das erste aufgenommene Transmissionsprofil zeigt eine homogene Probenverteilung (Abbildung 4.5). Durch die Zentrifugation der Probe konnte ein Sedimentationsprozess aufgezeigt werden und somit das Vorhandensein von Partikeln (Abbildung 4.6). Am deutlichsten sichtbar ist die Sedimentation beim Vergleich der ersten und letzten Messung (Abbildung 4.7).

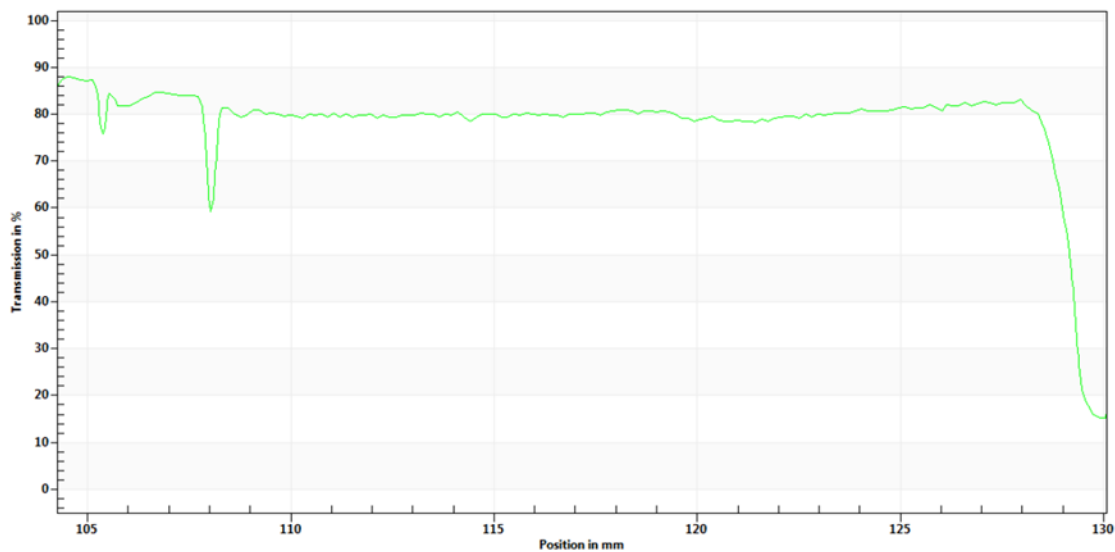


Abbildung 4.5: Startprofil der Messung mit einer konstanten Transmission von 109 mm bis 129 mm. Dadurch wird sichtbar, dass es sich um eine homogene Probe handelt.

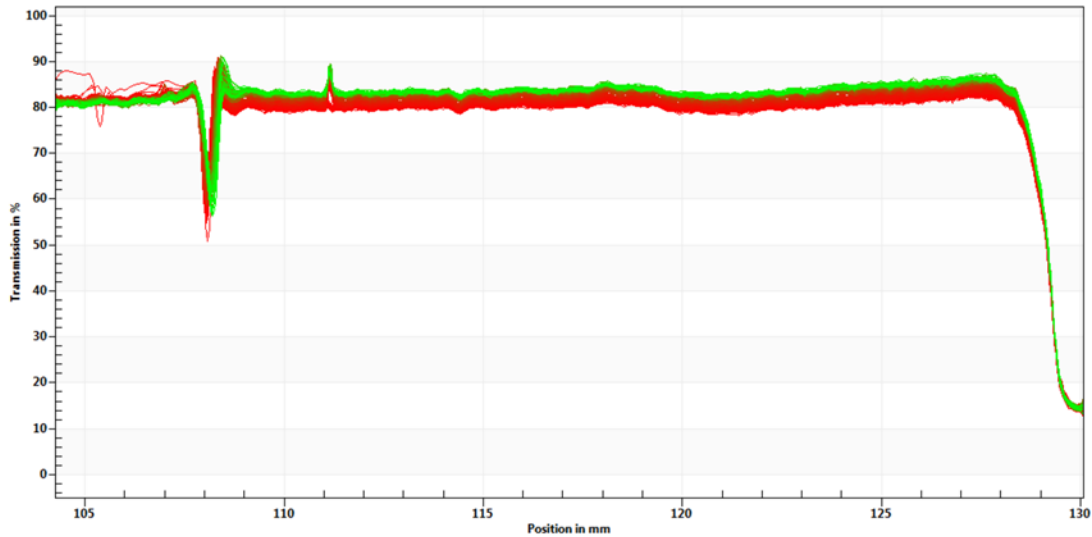


Abbildung 4.6: Rohdaten der LUMiSizer-Messung. Erste Messwerte sind in rot dargestellt, die letzten Messungen in grün. Eine Erhöhung der Transmission ist fast über die gesamte Küvette zu sehen (ca. 109 mm – 129 mm). Zusätzlich tritt am Boden der Küvette (129–130mm) Sedimentation auf, was an der Verringerung der Transmission zu sehen ist.

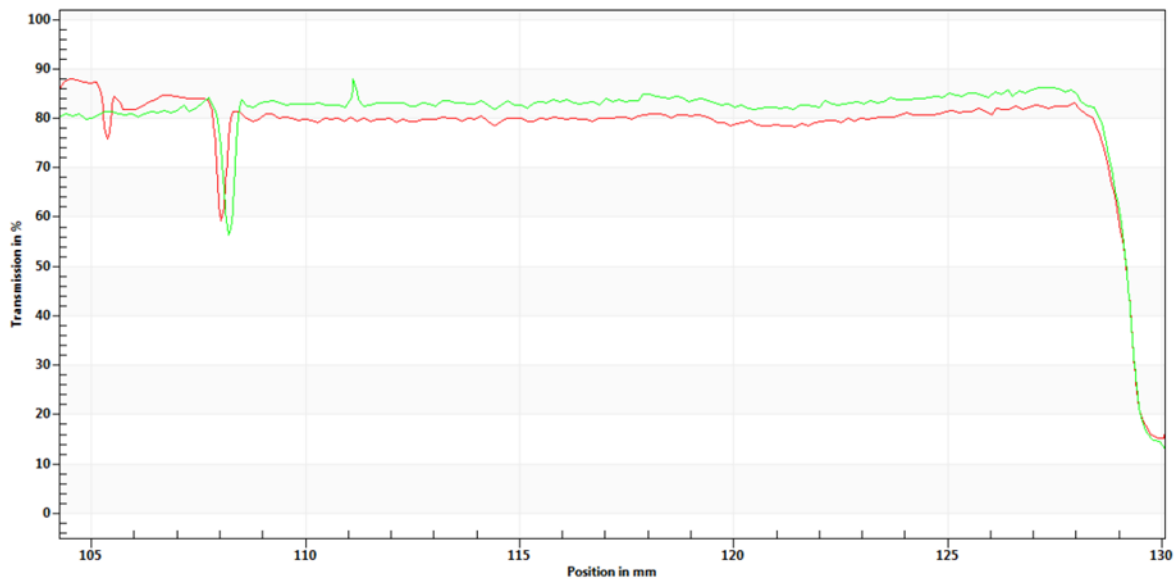


Abbildung 4.7: Erstes (rot) und letztes (grün) Profil der Messung. Die Änderung der Transmission ist deutlich zu erkennen, womit gezeigt werden kann, dass sich Partikel in der Suspension befinden und diese sedimentieren.

Die Transmission stieg mit Dauer der Messung, die Bildung eines Sediments konnte ebenfalls beobachtet werden. Aufgrund der geringen Partikelgröße ist die Bewegungsgeschwindigkeit sehr gering und Unterschiede zwischen direkt aufeinanderfolgenden Messungen nur minimal. Zur Verbesserung des Signal/Rauschverhältnisses wurde deshalb nur jedes fünfte aufgenommene Profil für die Auswertung verwendet (Abbildung 4.8). In Tabelle 4.5 sind zusätzlich die Ergebnisse als Zahlen zusammengefasst.

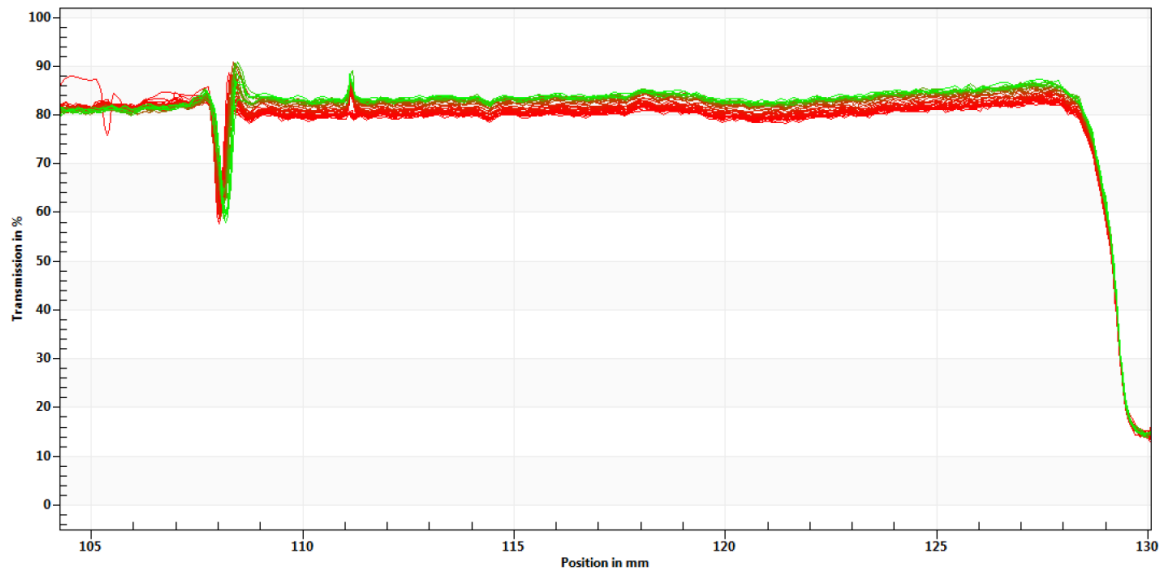


Abbildung 4.8: Dispersionsanalyse mit reduzierter Anzahl von Messwerten. Durch die Verwendung nur jeder fünften Messung kann der konstante Sedimentationsprozess einfacher beobachtet und das Signal/Rauschverhältnis verbessert werden.

Tabelle 4.5: Ergebnisse der Dispersionsanalyse. Der ermessene Mittelwert des Durchmessers liegt bei $16,97\text{nm} \pm 5,34$. Der Dx(90) gibt an das 90% des gemessenen Partikelvolumens $\leq 18,74\text{nm}$ sind.

Parameter	Wert
Median x50	15,97nm
harmonischer Mittelwert	16,97nm
Standardabweichung	5,34nm
Spannweite (x90-x10)/x50	0,1949
Modalwert	15,80nm
gewogener mittlerer Anzahldurchmesser	17,63
volumenspezifische Oberfläche	0,26*1/nm
Sauterdurchmesser	23,11nm
Dx(10)	15,62nm
Dx(16)	16,67nm
Dx(50)	15,97nm
Dx(84)	18,58nm
Dx(90)	18,74nm

4.1.8 Visualisierung

Das Rasterkraftmikroskop eignet sich, wie bereits erwähnt, hervorragend zur Visualisierung nanoskaliger Strukturen. In den folgenden Abbildungen 4.9 und 4.10 sind die Nanopartikel mit unterschiedlicher Tween 80 Tensidkonzentration abgebildet. Das Amplitudenbild, das Bild der gemessenen Höhe und das Phasenbild sind unten in dieser Reihenfolge für die jeweiligen Konzentrationen aufgelistet. Es können deutlich dieselben Strukturen auf allen Bildern erkannt werden. Als Spitze wurde die HQ.NSC14AL_BS verwendet, da es sich um eine weichere Probe handelte.

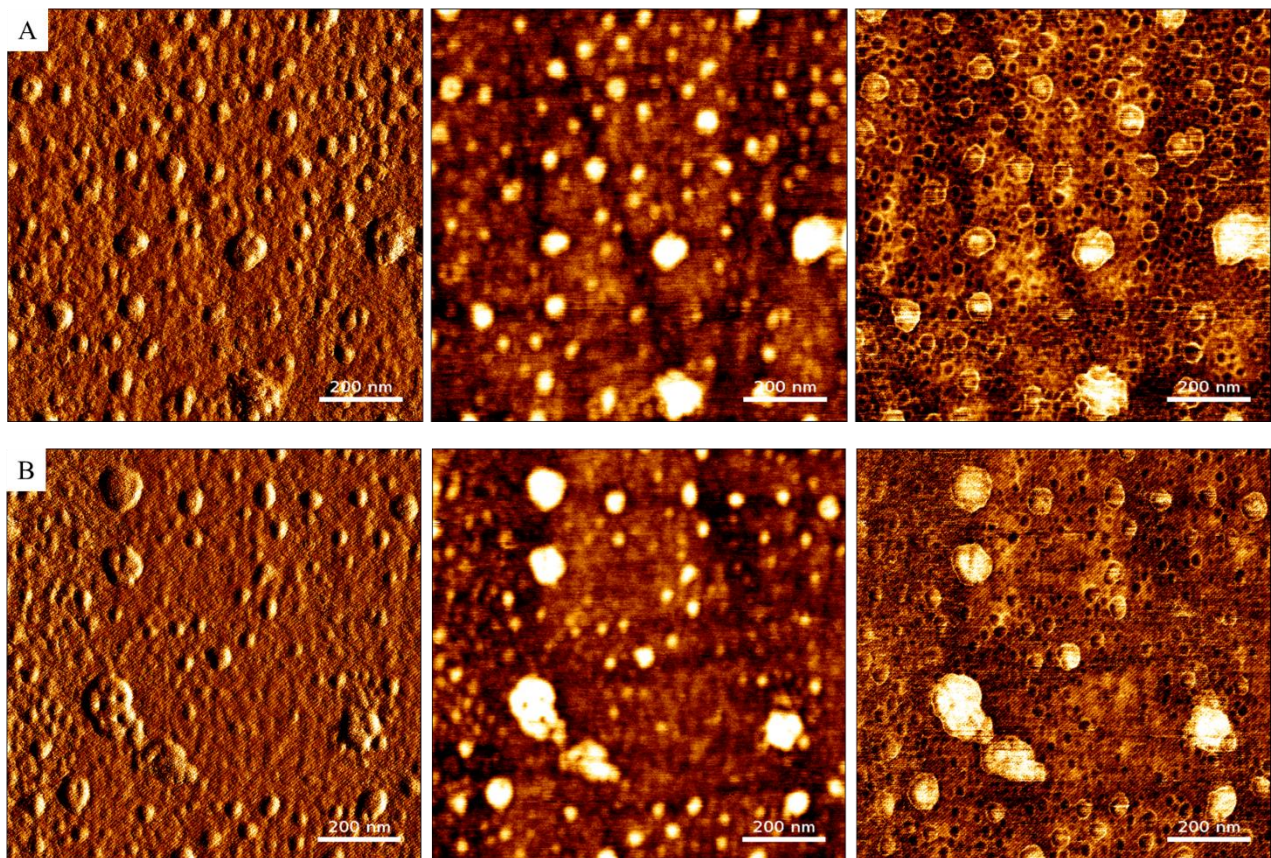


Abbildung 4.9: Vergleich der Nanopartikel mit unterschiedlicher Tensidkonzentration. Von links nach rechts: Amplitudenbild, Bild der gemessenen Höhe und Phasenbild. Auf dem Phasenbild stellen die unterschiedlichen Helligkeitsstufen Änderungen in der Oberflächenfestigkeit dar, was eine Materialeigenschaft ist. A: 1% Tween 80; B: 2% Tween 80.

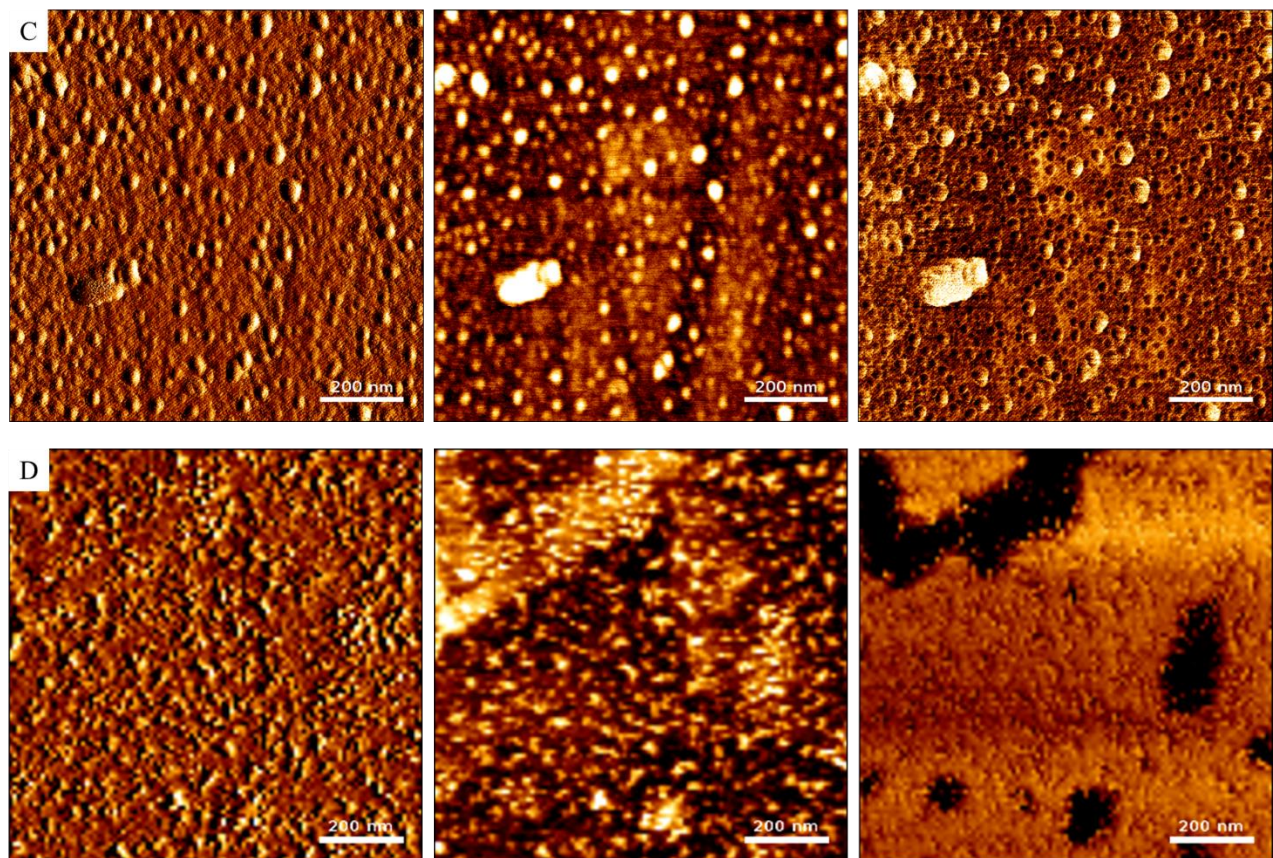
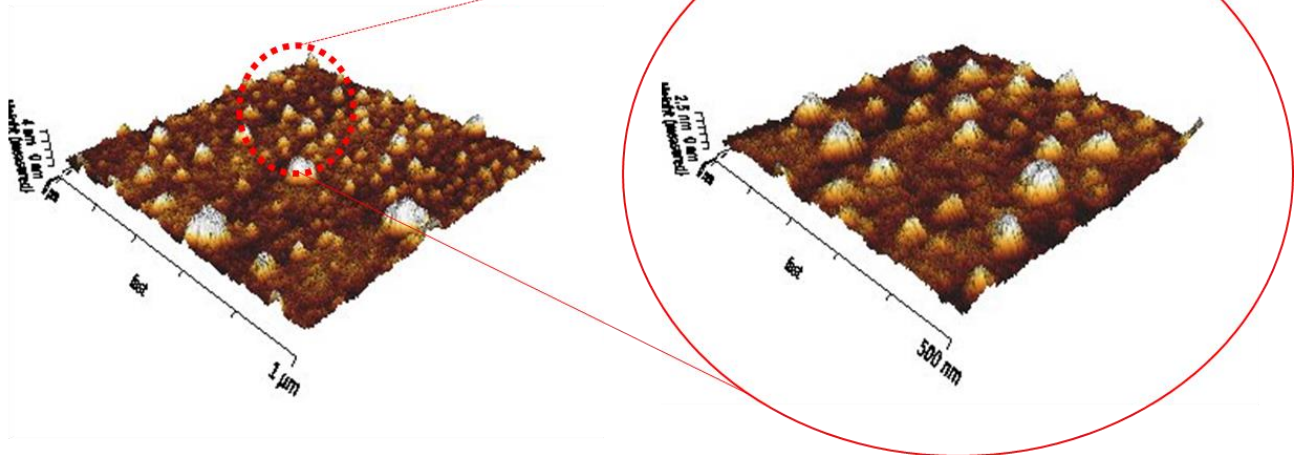


Abbildung 4.10: Vergleich der Nanopartikel mit unterschiedlicher Tensidkonzentration. Von links nach rechts: Amplitudenbild, Bild der gemessenen Höhe und Phasenbild. Auf dem Phasenbild stellen die unterschiedlichen Helligkeitsstufen Änderungen in der Oberflächenfestigkeit dar, was eine Materialeigenschaft ist. C: 3% Tween 80; D: 4% Tween 80.

Durch die Gerätesoftware lässt sich, für eine noch bessere Vorstellung der Strukturen, eine 3D-Übersicht der Probe erstellen. Diese sind in Abbildung 4.11 und 4.12 zusammengefasst. Der abgerasterte Bereich auf der linken Seite ist jeweils $1 \times 1 \mu\text{m}$ groß, wovon jeweils noch ein $0,5 \times 0,5 \mu\text{m}$ großer Abschnitt vergrößert wurde.

A



B

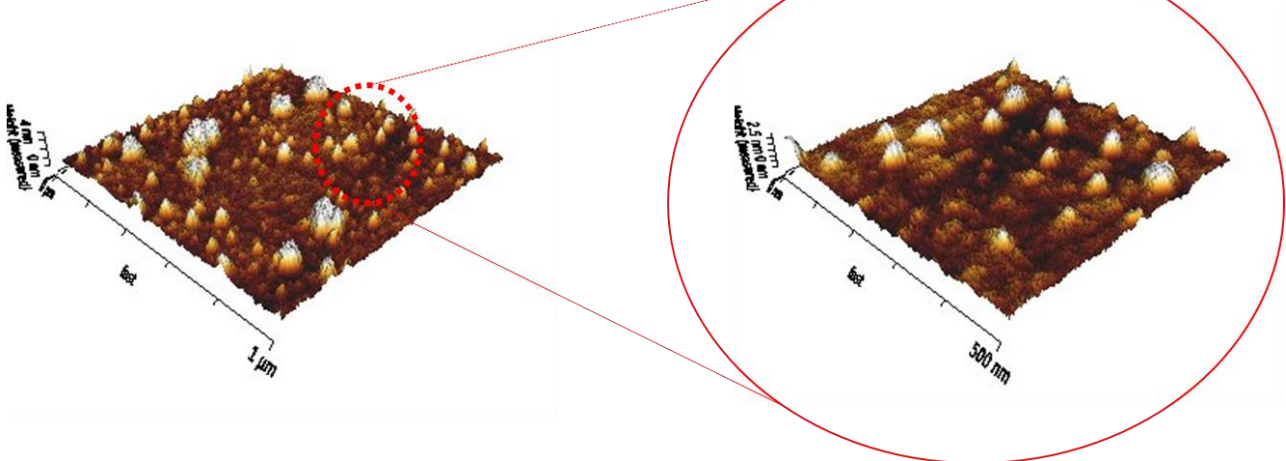
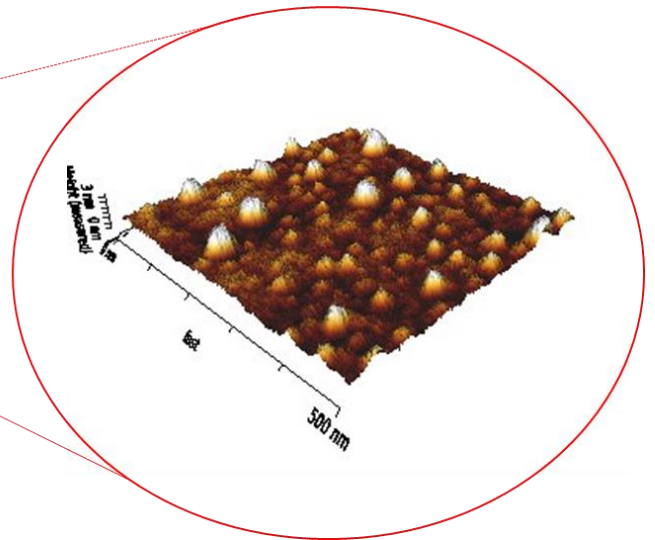
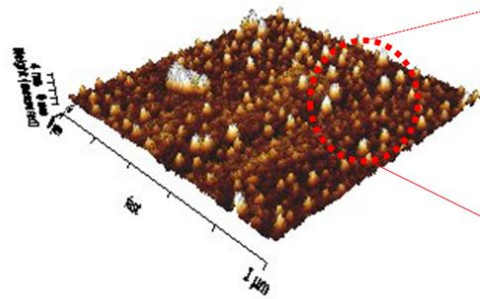


Abbildung 4.11: 3D-Übersicht der hergestellten Partikel mit unterschiedlicher Tensidkonzentration. Linke Seite des Bildes: $1 \times 1 \mu\text{m}$ Scanweite, rechte Seite des Bildes ist eine Vergrößerung der linken: $0,5 \times 0,5 \mu\text{m}$ Scanweite. Auf allen Bildern sind runde Strukturen zu erkennen. A: 1% Tween 80; B: 2% Tween 80.

C



D

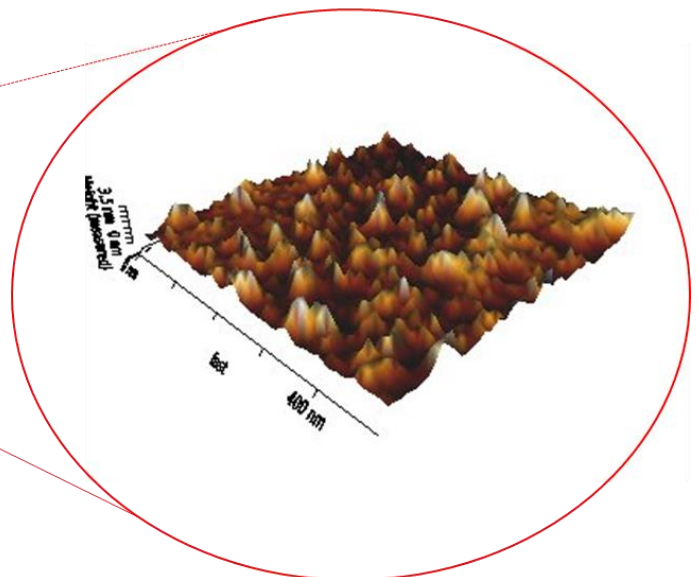
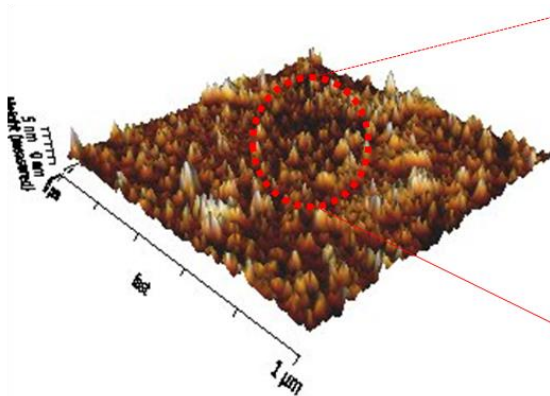


Abbildung 4.12: 3D-Übersicht der hergestellten Partikel mit unterschiedlicher Tensidkonzentration. Linke Seite des Bildes: $1 \times 1 \mu\text{m}$ Scanweite, rechte Seite des Bildes ist eine Vergrößerung der linken: $0,5 \times 0,5 \mu\text{m}$ Scanweite. Auf allen Bildern sind runde Strukturen zu erkennen. C: 3% Tween 80; D: 4% Tween 80.

4.2 Nanobubbles

4.2.1 Charakterisierung der Bubbles

Mit der unter 3.4.1 beschriebenen Methode wurden Nanobubbles hergestellt, wobei der Durchmesser der entstandenen Nanobubbles mittels Laserdiffraktometrie untersucht wurde. Die Nanobubbles unterschieden sich nur in ihrer Tensidkonzentration. In jeder Formulierung wurden mehrere Bubblefraktionen gefunden, wobei sich eine im Nanometer-, die anderen im Mikrometerbereich befanden. Exemplarisch ist hierfür Abbildung 4.13.

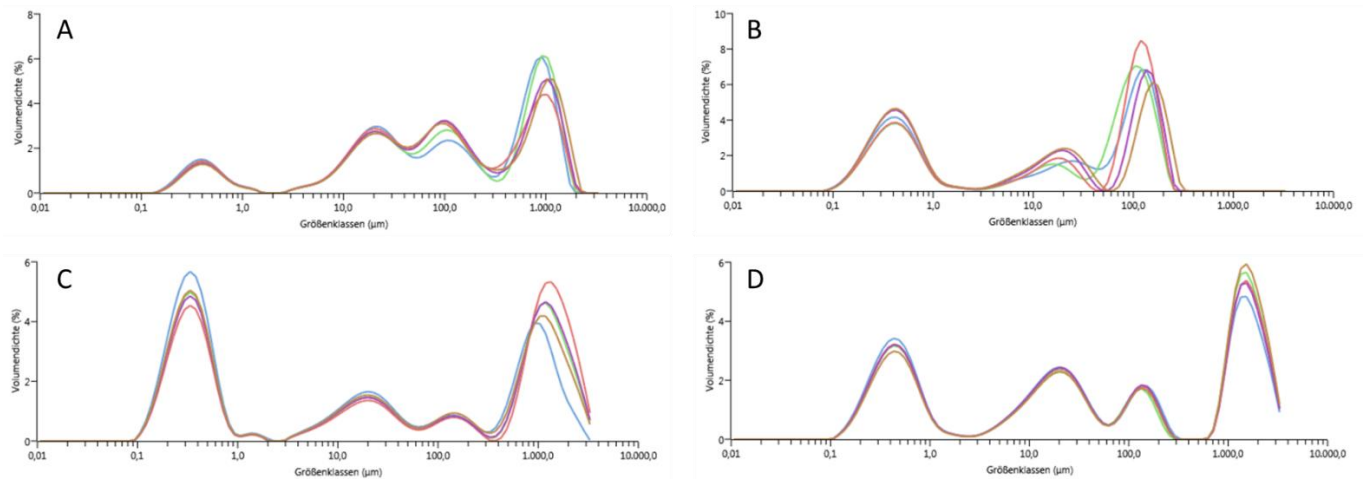


Abbildung 4.13: Grafische Auswertung der Ergebnisse der Laserdiffraktometrie. A und B: 1%ige Tween 80 Formulierung. Nur ein geringer Volumenanteil der Formulierung ist im nanoskaligen Bereich. C und D: 2%ige Tween 80 Formulierung. Diese Formulierung hat einen hohen Volumenanteil an Nanobubbles.

Die Ergebnisse die in Abbildung 4.14 und Tabelle 4.6 zusammengefasst sind fokussieren sich nur auf den nanoskaligen Bereich. Diese Aufbereitung der Nanobubbles ist unter 3.5.1 beschrieben. Für die 1%ige Tween 80 NB-Formulierung konnte für Dx (50) ein Durchmesser von $0,245\mu\text{m}\pm 0,023\mu\text{m}$ und für Dx (99) ein Durchmesser von $0,653\mu\text{m}\pm 0,110\mu\text{m}$ ermittelt werden, die 2%ige Tween 80 NB-Formulierung hatte bei Dx (50) einen Durchmesser von $0,268\mu\text{m}\pm 0,058\mu\text{m}$, hingegen bei Dx (99) nur einen von $0,586\mu\text{m}\pm 0,015\mu\text{m}$. Die anderen beiden Formulierungen, d.h. die 3%ige und die 4%ige Tween 80 NB-Formulierung hatten ähnliche Durchmesser bei Dx (50), welche bei $0,284\mu\text{m}\pm 0,048\mu\text{m}$ bzw. bei $0,282\mu\text{m}\pm 0,093\mu\text{m}$ lagen. Bei Dx (99) lagen die Werte für beide Formulieren ebenfalls höher als bei den anderen beiden, wobei bei der 3%igen Tween 80 NB-Formulierung für Dx (99) ein Durchmesser von $0,696\mu\text{m}\pm 0,107\mu\text{m}$ ermittelt wurde, die 4%igen Tween 80 NB-Formulierung hatten einen Durchmesser von $0,752\mu\text{m}\pm 0,131\mu\text{m}$.

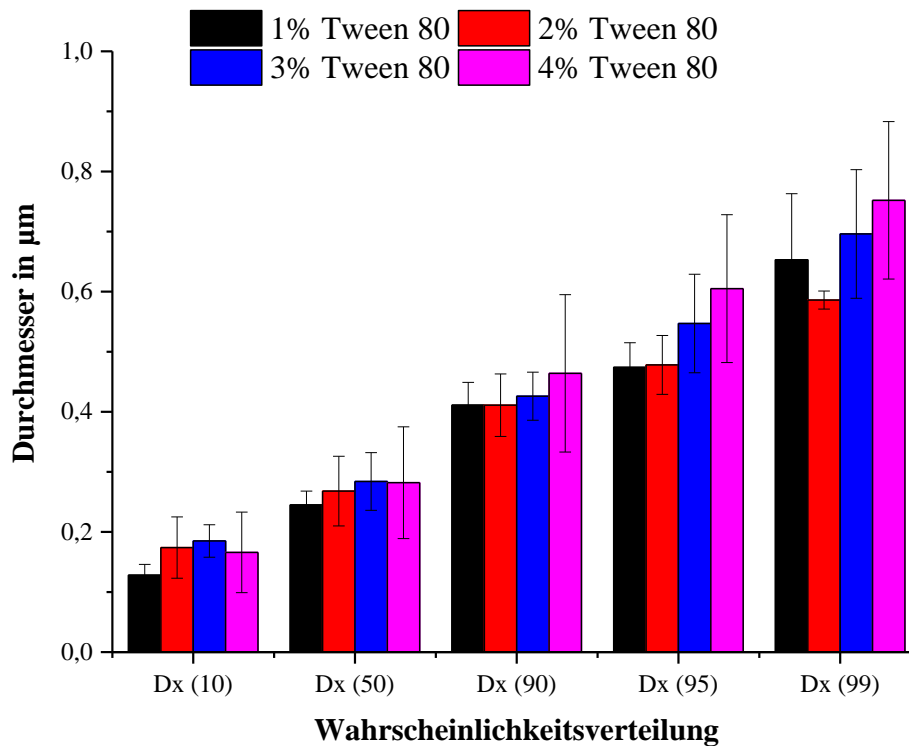


Abbildung 4.14: Ergebnisse der Laserdiffraktometrie als Wahrscheinlichkeitsverteilung angegeben. Zu sehen sind jeweils die Dx (10), Dx (50), Dx (90), Dx (95), Dx (99) Werte der einzelnen Tween 80 Formulierungen.

Tabelle 4.6: Wahrscheinlichkeitsverteilung der Durchmesser der einzelnen Tween 80 NB-Formulierungen in μm .

	1% Tween	2% Tween	3% Tween	4% Tween
Dx(10)μm	0,128 \pm 0,018	0,174 \pm 0,054	0,185 \pm 0,027	0,166 \pm 0,067
Dx(50)μm	0,245 \pm 0,023	0,268 \pm 0,058	0,284 \pm 0,048	0,282 \pm 0,093
Dx(90)μm	0,411 \pm 0,038	0,411 \pm 0,052	0,426 \pm 0,040	0,464 \pm 0,131
Dx(95)μm	0,474 \pm 0,0041	0,478 \pm 0,049	0,547 \pm 0,082	0,605 \pm 0,123
Dx(99)μm	0,653 \pm 0,110	0,586 \pm 0,015	0,696 \pm 0,107	0,752 \pm 0,131

Daraufhin wurden die Tween 80 NB-Formulierungen auf ihre Lagerstabilität überprüft. Die Vorgehensweise ist in 3.5.1 zusammengefasst. Bezüglich der Lagerstabilität erwiesen sich alle Tween 80 NB-Formulierungen als ungeeignet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.7 als Volumenanteil der nanoskaligen Fraktion an der Gesamtprobe zusammengefasst. Abbildung 4.15 soll exemplarisch eine grafische Auswertung dieses Versuchs zeigen. Sie zeigt deutlich, dass die nanoskalige Fraktion nach 10min kaum noch auffindbar ist. Der nanoskalige Volumenanteil der 1%igen Tween 80 NB Formulierung betrug nur noch 7,09% \pm 1,45%, der der 2%igen Tween 80 NB-Formulierung 8,24% \pm 1,02%, der Volumenanteil der nanoskaligen Fraktion der 3%igen Formulierung hingegen betrug nur 5,34% \pm 3,62% und der der 4%igen 6,87% \pm 1,56%. Dieser Zerfall war auch makroskopisch an den Tween 80 NB-Formulierungen sichtbar.

Tabelle 4.7: Wahrscheinlichkeitsverteilung der Durchmesser der einzelnen Tween 80 NB-Formulierungen nach 10min in μm . Es ist keine nanoskalige Fraktion mehr in der Wahrscheinlichkeitsverteilung sichtbar.

	1% Tween	2% Tween	3% Tween	4% Tween
Dx(10)μm	8,58 \pm 6,77	7,56 \pm 4,23	8,66 \pm 2,75	9,56 \pm 1,96
Dx(50)μm	1320 \pm 32,00	1125 \pm 25,00	1390 \pm 11,30	1520 \pm 40,00
Dx(90)μm	2420 \pm 19,00	1960 \pm 19,00	1800 \pm 14,00	2250 \pm 19,00
Dx(95)μm	2720 \pm 15,00	2120 \pm 21,00	2480 \pm 26,00	2910 \pm 23,40
Dx(99)μm	3240 \pm 10,30	2890 \pm 11,00	3010 \pm 15,60	3600 \pm 28,00

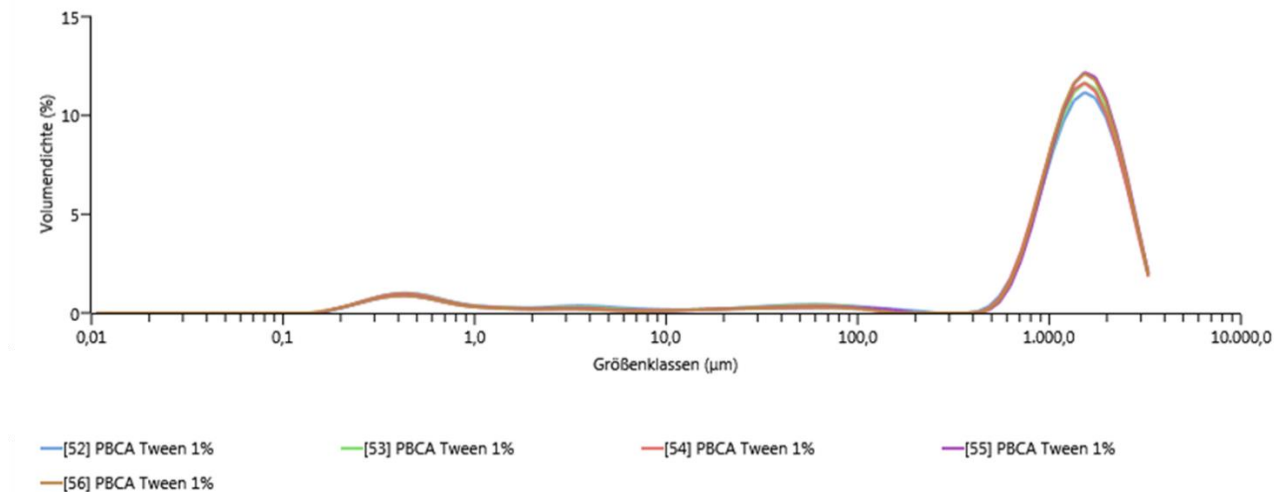


Abbildung 4.15: 1%ige Tween 80 NB-Formulierung nach Lagerung, exemplarisch für alle Formulierungen. Der Anzahl der Bubbles in der nanoskaligen Fraktion ist nur noch sehr gering und es haben sich Bubbles im Millimeterbereich gebildet.

Der mögliche Einfluss von NaCl-Ionen auf die Stabilität der Nanobubble-Formulierungen wurde im Anschluss geprüft und die Vorgehensweise ist unter 3.6.2 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.8 zusammengefasst. Nur bei der 2%igen Tween 80 Formulierung und einer Konzentration von 0,1mol/l NaCl gelang eine erfolgreiche Verbesserung der Stabilität. Die grafische Auswertung der erfolgreichen Kombination ist in Abbildung 4.16 dargestellt. Jedoch nahm der nanoskalige Anteil während der Messreihe stetig ab.

Tabelle 4.8: Einfluss der NaCl-Konzentration auf die Stabilität der Nanobubbles. -: keine erfolgreiche Herstellung; + erfolgreiche Herstellung, keine Verbesserung der Stabilität; ++ erfolgreiche Herstellung und erfolgreiche Stabilisierung.

Tensidkonzentration	NaCl-Konzentration [mol/l]	Stabilität
1% Tween 80	0,01	+
	0,10	+
	1,00	-
2% Tween 80	0,01	+
	0,10	++
	1,00	+
3% Tween 80	0,01	+
	0,10	+
	1,00	+
4% Tween 80	0,01	+
	0,10	-
	1,00	+

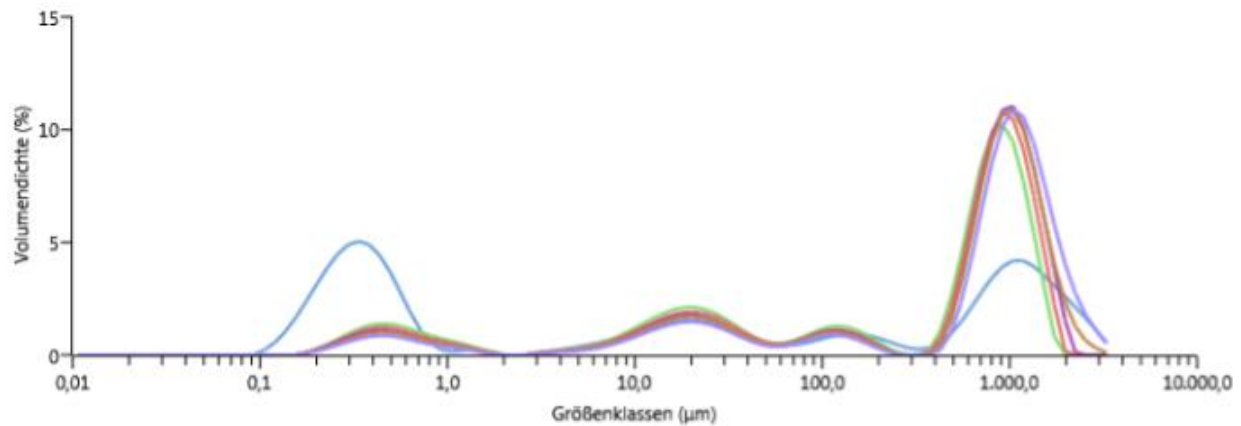


Abbildung 4.16: Grafische Auswertung der Größenanalyse der Laserdiffraktometrie. Die blaue Kurve stellt die erste Messung dar, danach kommt zeitlich gesehen Grün, Rot, Lila und Braun/Orange. Der Volumenanteil der nanoskaligen Fraktion verringert sich innerhalb der Messreihe drastisch.

4.2.2 Visualisierung der Nanobubbles

4.2.2.1 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie eignet sich ebenfalls hervorragend um die entstandenen Nanobubbles zu visualisieren. Hierfür wurden die Nanobubbles nach Methode 3.4.3 hergestellt und wie unter 3.2.3 beschrieben präpariert und vermessen. In der folgenden Abbildung 4.17-4.18 sind die Nanobubbles von links nach rechts in Amplituden, Höhen und Phasenbild dargestellt. Zudem wurden ebenfalls 3D-Übersichten erstellt, um eine bessere Vorstellung der Struktur zu bekommen. Bildreihe A und Bildreihe B sind identisch. Jedoch wurde die Scanrichtung gedreht, wodurch ausgeschlossen werden konnte, dass es sich bei den abgebildeten Strukturen um Messfehler handelt. Auf Bildreihe A, sowie B lässt sich gut ein einzelnes Nanobubble erkennen, welches einen Durchmesser von etwas unter 200nm hat. Bildreihe C zeigt einen Bereich mit mehreren Nanobubbles, welche teils etwas größer sind und einen Durchmesser von etwa 280nm aufweisen. Im Phasenbild erkennt man einen Materialunterschied innerhalb der Nanobubbles. Am linken unteren Rand lässt sich gut ein scharfer Übergang zwischen verschiedenen Stoffen erkennen. Bei weiterer Vergrößerung wird das die Nanobubbles umschließende Tensid sichtbar, welches teilweise aufgeplatzt ist (Bildreihe D und E). Das Phasenbild dieser Abbildungen zeigt erneut einen Strukturunterschied zwischen Kern und Hülle.

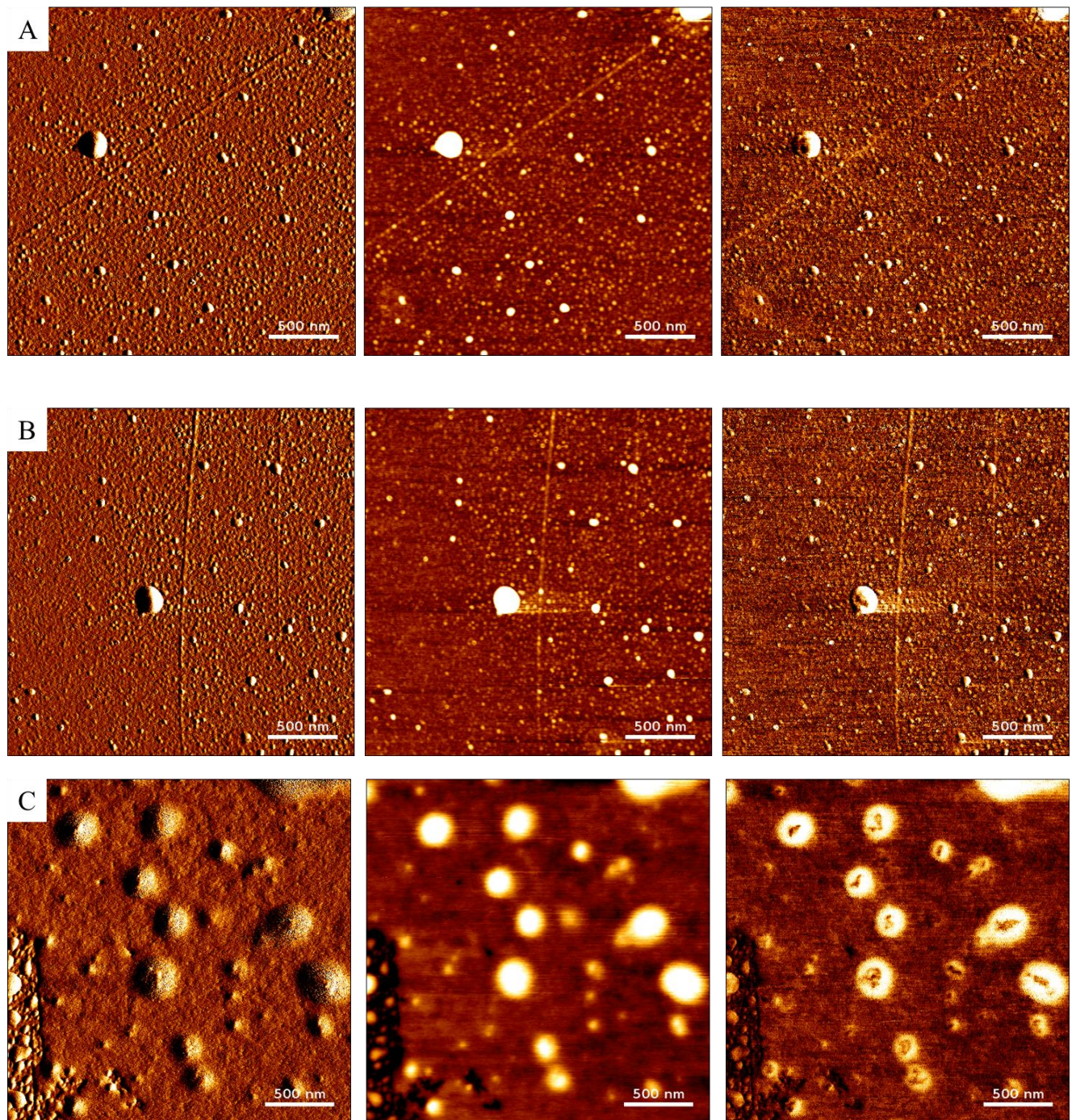


Abbildung 4.17: Auswertung der rasterkraftmikroskopischen Vermessung, Bildreihe von links nach rechts: Amplitudenbild, Höhenbild und Phasenbild. A und B: Um 90° verdreht gemessene Bilder der Nanobubbles. Diese Messtechnik wird zur Qualitätskontrolle der Bilddarstellung angewendet; C: Mehrere Nanobubbles, sichtbarer Phasenübergang am linken Bildrand.

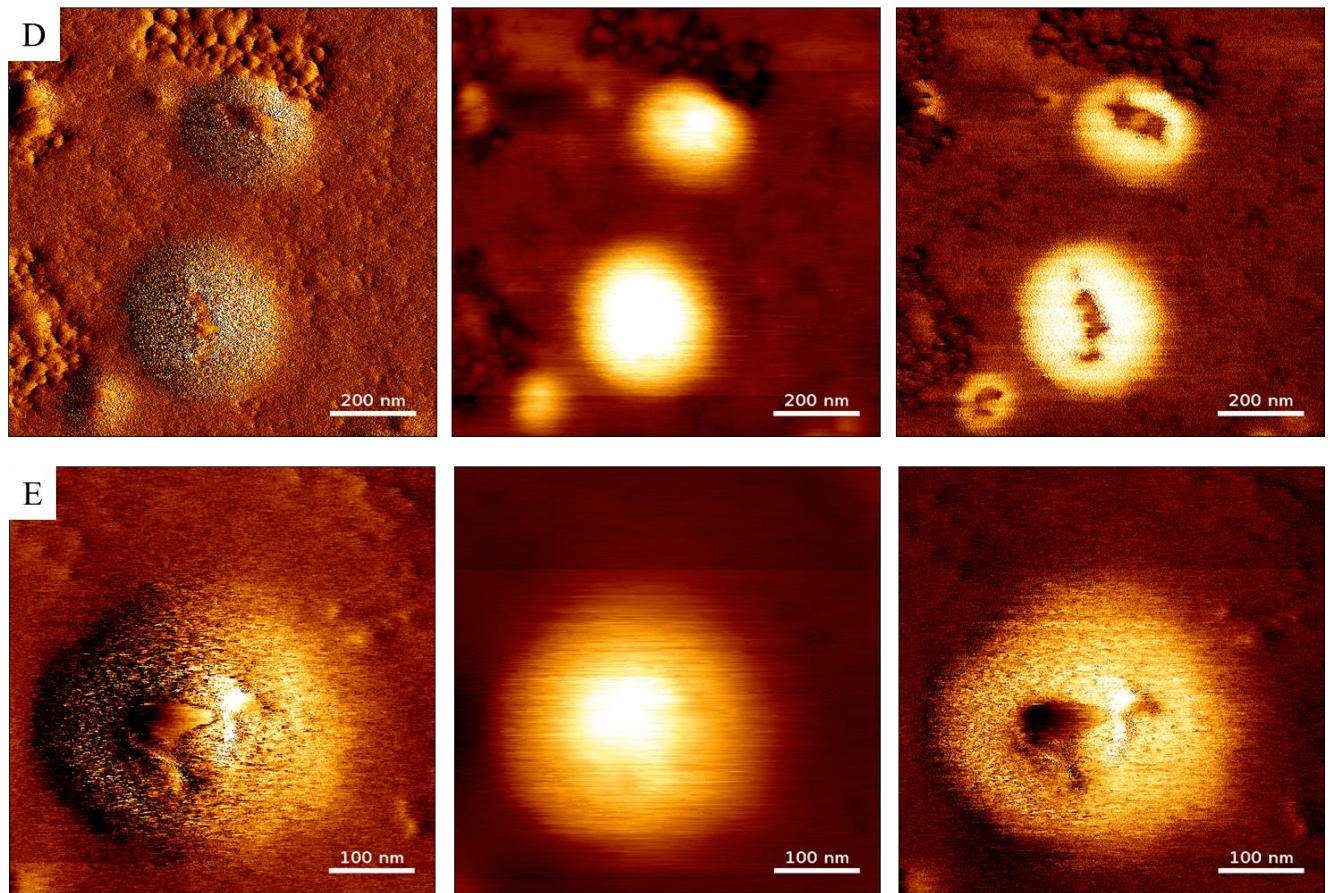


Abbildung 4.18: Auswertung der rasterkraftmikroskopischen Vermessung, Bildreihe von links nach rechts: Amplitudenbild, Höhenbild und Phasenbild. D: Vergrößerung zweier Nanobubbles. Das Phasenbild zeigt deutliche Materialunterschiede; E: Vergrößerung eines einzelnen Nanobubbles. Die Hülle ist oben aufgerissen wodurch der Materialunterschied zwischen Hülle und Kern sichtbar wird.

Ebenfalls angefügt sind in Abbildung 4.19 die den Bildern zugehörigen 3D-Übersichten, um eine bessere Vorstellung des gezeigten zu erhalten. Alle Buchstabenbetitelungen stimmen jeweils bei beiden Bildern überein, sodass eine leichte Zuordnung erfolgen kann.

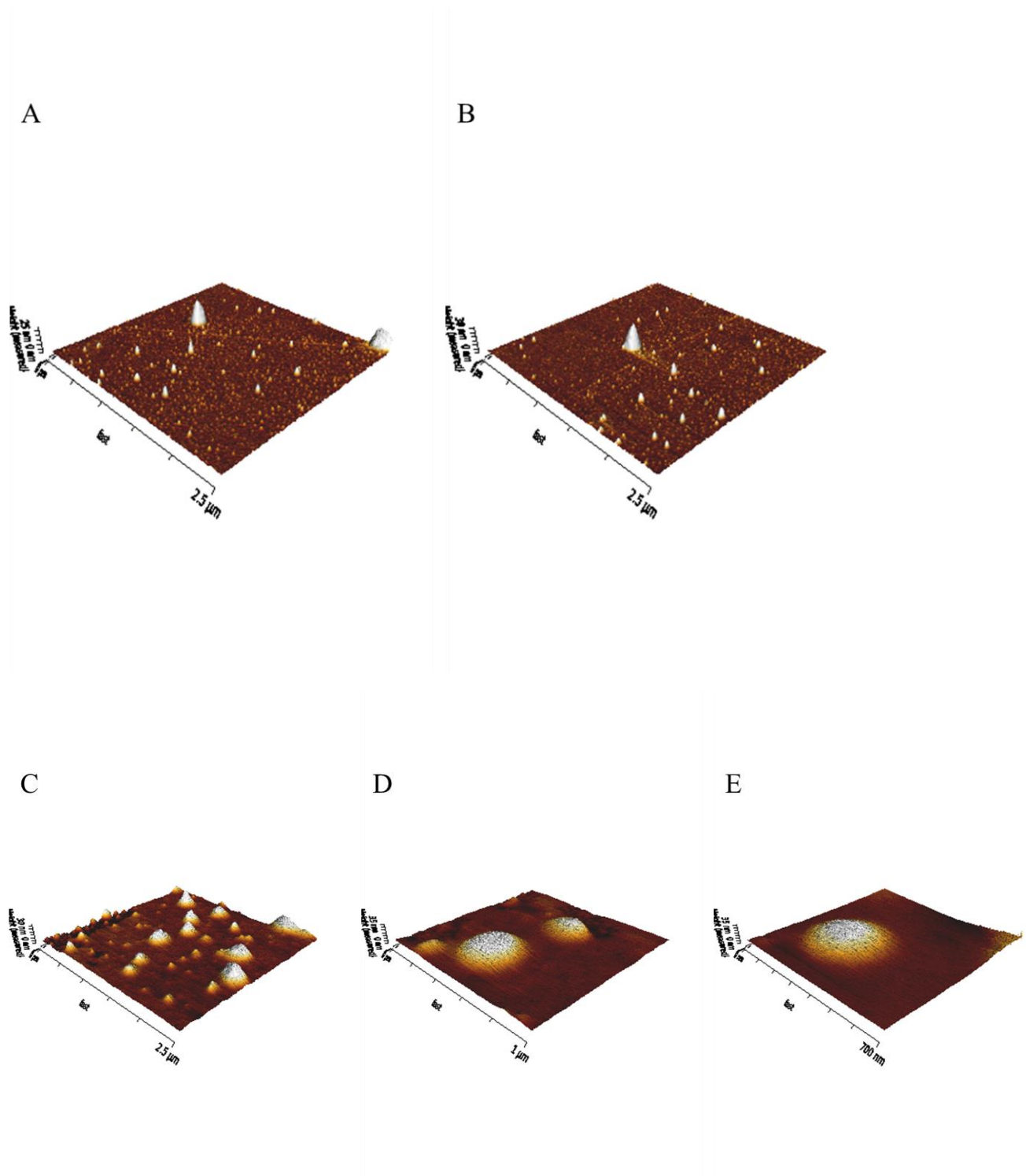


Abbildung 4.19: 3D-Übersicht der hergestellten Nanobubbles. A und B: Um 90° verdreht gemessene Bilder der Nanobubbles. Diese Messtechnik wird zur Qualitätskontrolle der Bilddarstellung angewendet; C: Nanobubblepopulation mit mehreren Größenfraktionen, Scanweite 2,5x2,5µm; D: Vergrößerung zweier Nanobubbles, Scanweite 1x1µm. E: Nochmalige Reduktion der Scanweite auf 0,7x0,7µm und somit Vergrößerung eines einzelnen Nanobubbles.

4.2.2.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie eignet sich ebenfalls hervorragend, um Strukturen im nano- und mikroskaligen Bereich zu visualisieren. Die Proben wurden wie unter 3.5.3 beschrieben vorbereitet und anschließend vermessen. Die Ergebnisse der Messung sind als Bilder in Abbildung 4.17 dargestellt. Bild A zeigt eine Übersicht, aufgenommen mit 6000facher Vergrößerung. Es ist schon im Ansatz zu erkennen, was jedoch auf den Bildern B und C besser sichtbar wird, dass es sich bei vielen der abgebildeten Strukturen um Donuts handelt. Diese Donuts sind vergrößert (30000fach) auf Bild B mit roten Pfeilen markiert, auf Bild C sind sie deutlicher erkennbar. 50 dieser Partikel sind digital vermessen worden und ihr Durchmesser betrug $312\text{nm} \pm 79,28\text{nm}$.

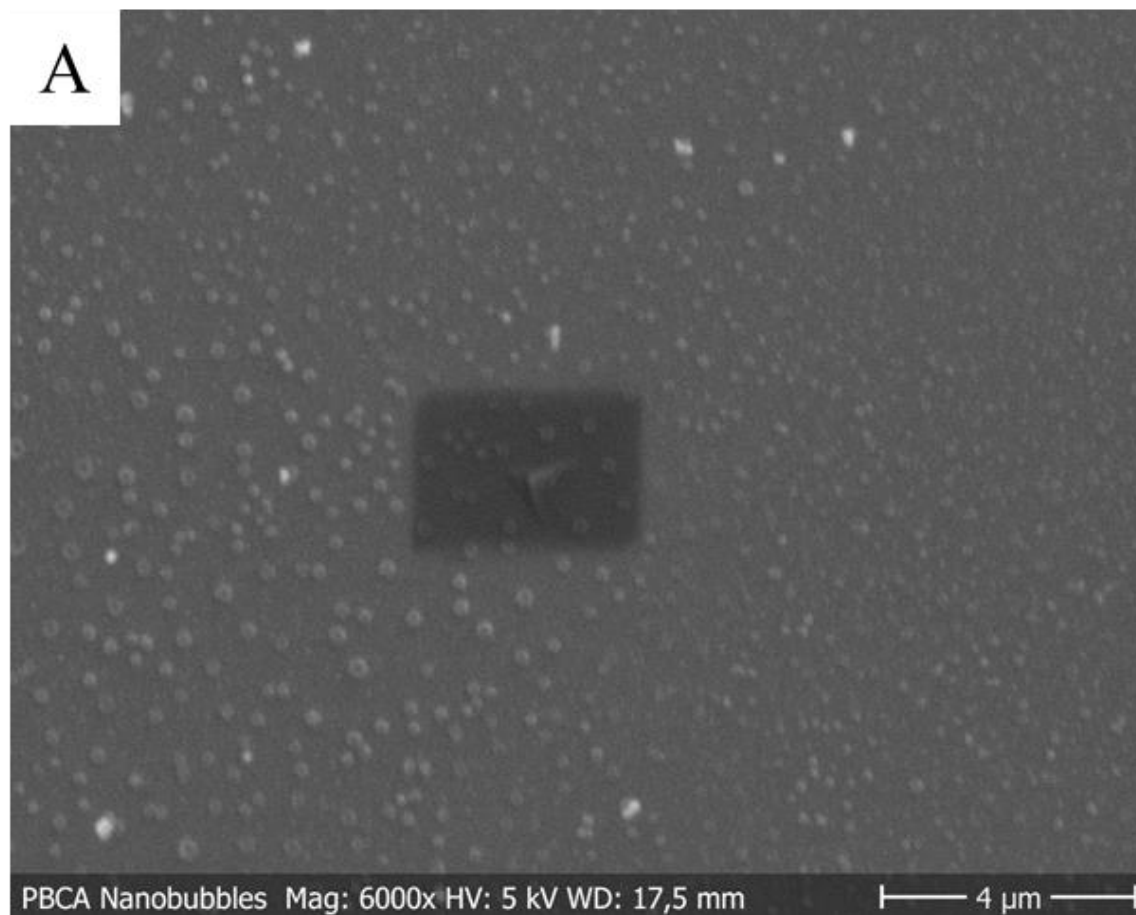


Abbildung 4.20: Aufnahmen der Nanobubbles, aufgenommen mit einem Rasterelektronenmikroskop. A: Übersichtsbild mit einer Vergrößerung von 6000x, der dunkle Bereich entstand durch das Vergrößern.

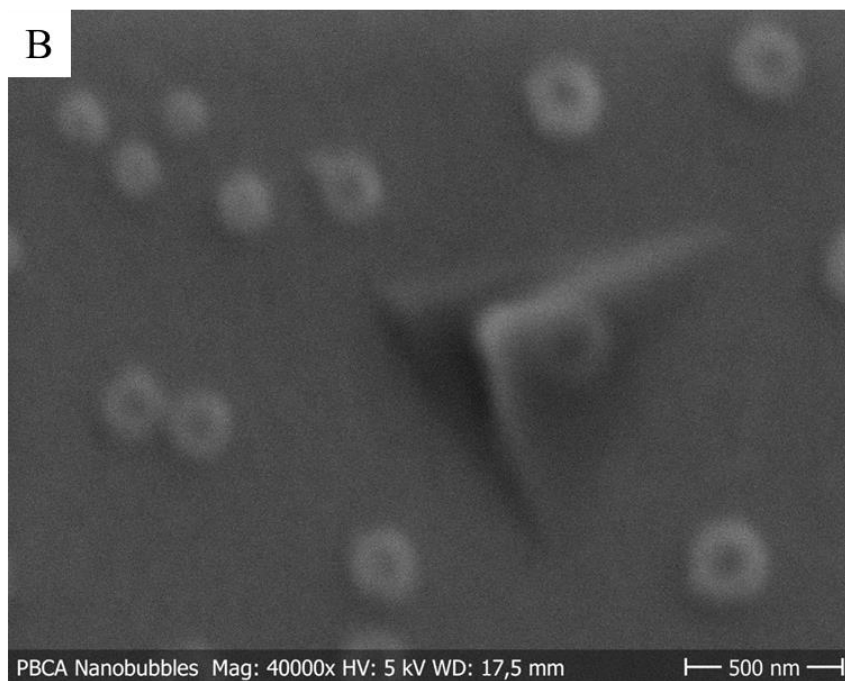
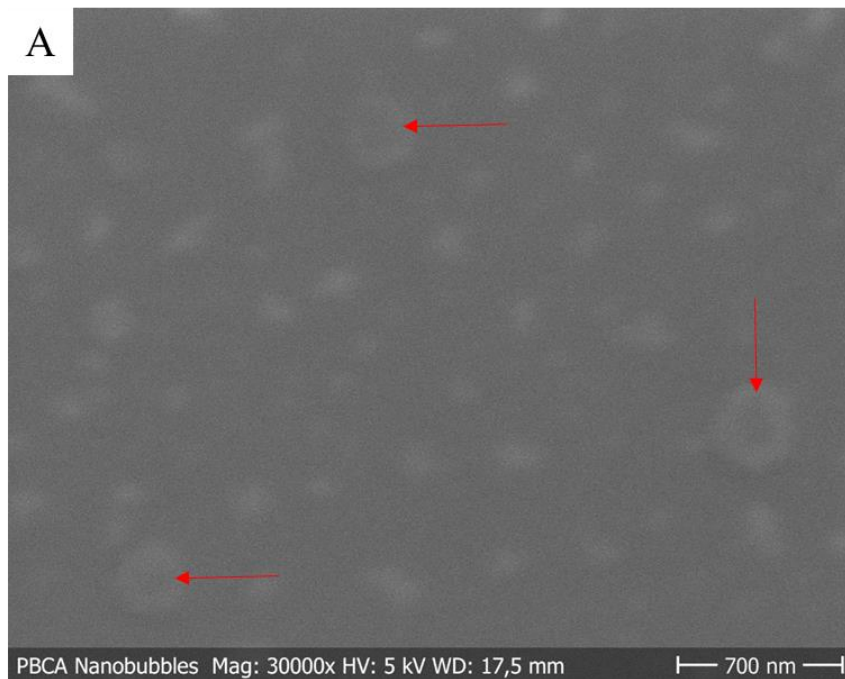


Abbildung 4.21: Aufnahmen der Nanobubbles, aufgenommen mit einem Rasterelektronenmikroskop. A: Bei 30000facher Vergrößerung sind schwach, mit den roten Pfeilen gekennzeichnet, Donut-artige Strukturen zu beobachten; B: 40000fach Vergrößerung zeigt uns ebenfalls, diesmal deutlicher sichtbar, Donut-artige Strukturen mit beiliegenden kleineren runden Partikeln.

4.2.2.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Zur weiteren Visualisierung der Nanobubbles wurde ein Transmissionselektronenmikroskop verwendet, welches unter 3.5.4 beschrieben ist. 3.5.4 enthält ebenfalls die Präparation und Vorbereitung der Proben. Abbildung 4.22 zeigt die Ergebnisse der Messung. Bild A zeigt mehrere 200nm große kugelförmige Strukturen. Auf Bild B ist eine einzelne etwa 250nm große runde Struktur zu erkennen, welche von ineinander geflossenem Tensid umgeben ist.

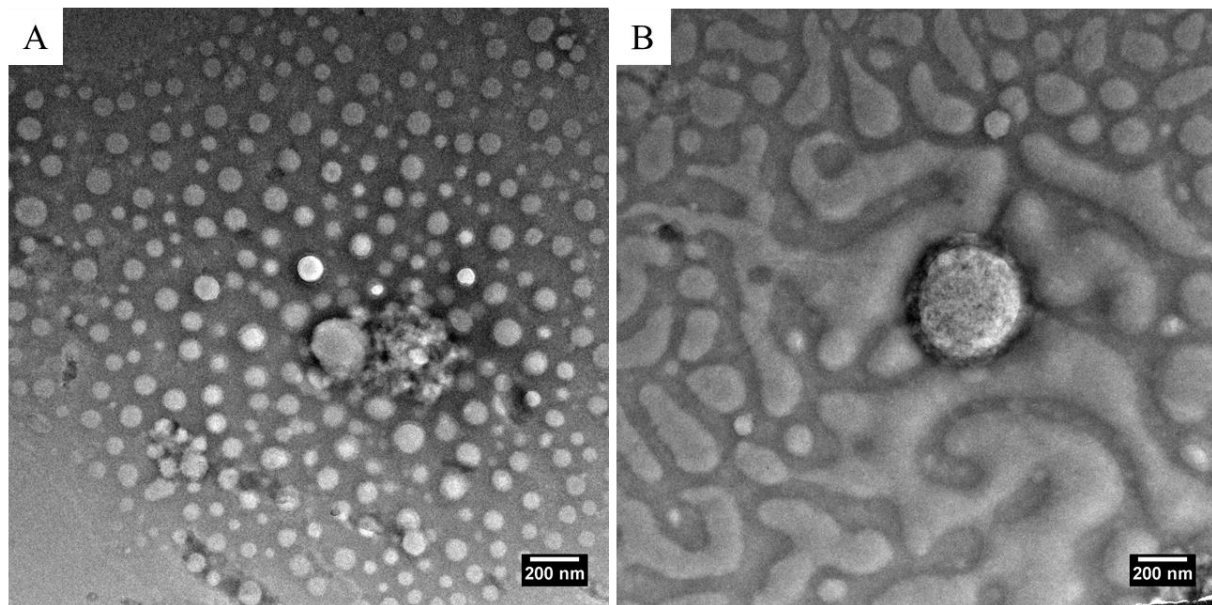


Abbildung 4.22: Aufnahmen des Transmissionselektronenmikroskops. A: Mehrere kugelförmige, etwa 200nm große Strukturen; B: Kugelförmige Struktur mit dem Durchmesser von etwa 250nm umgeben von zusammengeflossenem Tensid.

4.2.2.4 Lichtmikroskopie

Zur Vervollständigung der Visualisierungstechniken wurde das Lichtmikroskop benutzt. Die Probenvorbereitung ist unter 3.5.5 beschrieben. In Abbildung 4.23 sind die Bilder zusammengefasst.

Durch digitale Auswertung ergaben sich für 100 Nanobubbles im Mittel ein Durchmesser von $0,395\mu\text{m} \pm 0,054\mu\text{m}$. Auf einigen Bildern ist ein „funkeln“ der Nanobubbles zu erkennen.

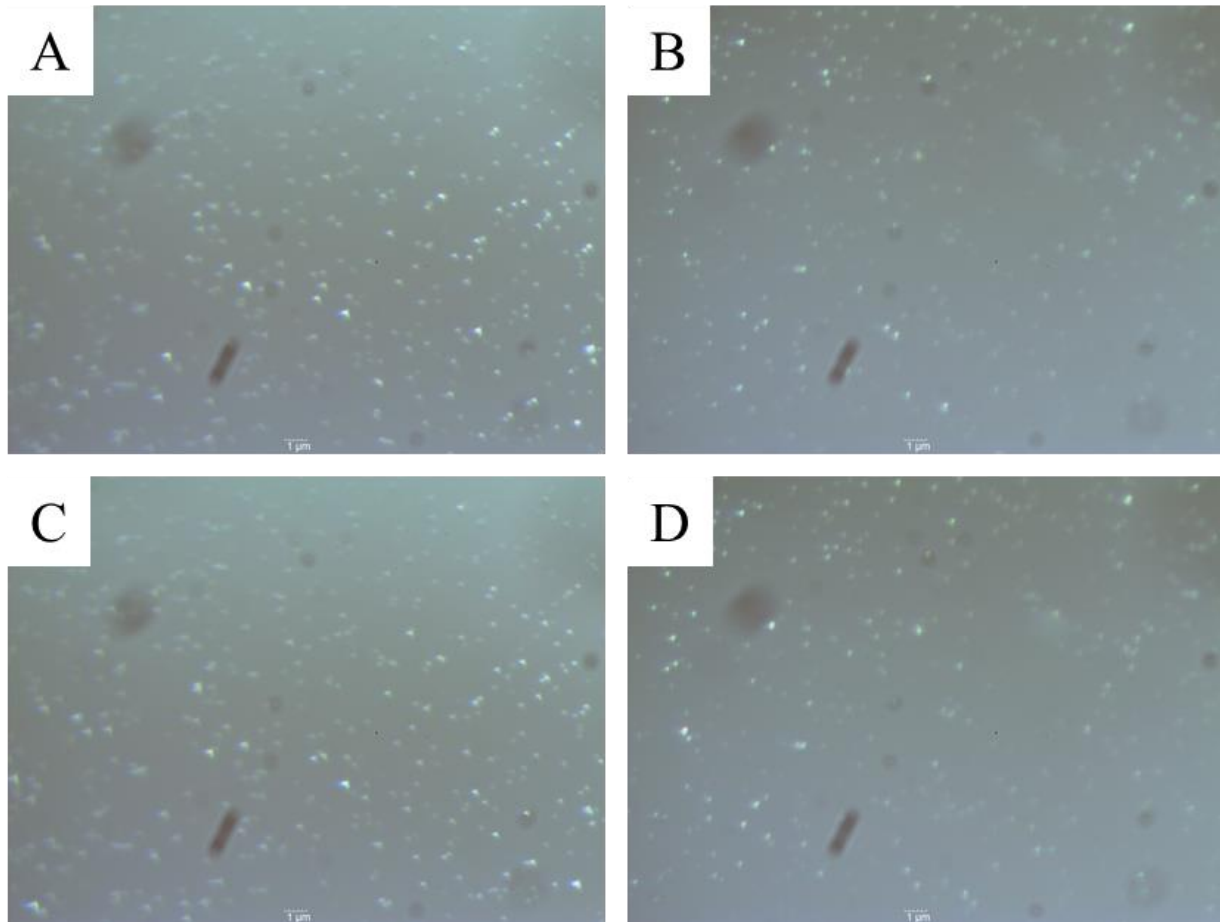


Abbildung 4.23: Lichtmikroskopische Aufnahmen einer Nanobubble-Formulierung. A-D: Sichtbare Population von Nanobubbles. Alle bewegen sich in Lösung und von einzelnen Nanobubbles geht ein „Funkeln“ aus. Der mittlere gemessene Durchmesser betrug $0,395\mu\text{m} \pm 0,054\mu\text{m}$.

4.3 Biokompatibilität

4.3.1 Evaluierung über das CAM Modell

Anhand des CAM Modells wurde die Biokompatibilität der Tween 80 Nanopartikel getestet. Die Methode ist unter 3.8.1 beschrieben. 10 befruchtete Hühnereier wurden bebrütet und die Tween 80/PBCA Nanopartikel in höchster angewandter Tensidkonzentration (4% Tween 80) am EDD 10 in die Blutbahn appliziert. Die Überlebensrate der Hühner-Embryos ist in Abbildung 4.24 dargestellt. Alle 10 Embryos hatten bis zur Injektion überlebt. Nach Injektion waren alle Embryos bis EDD 14 am Leben, jedoch verstarb ein Hühner-Embryo an EDD 15, sowie ein weiteres am EDD 16, dem abschließenden Untersuchungstag.

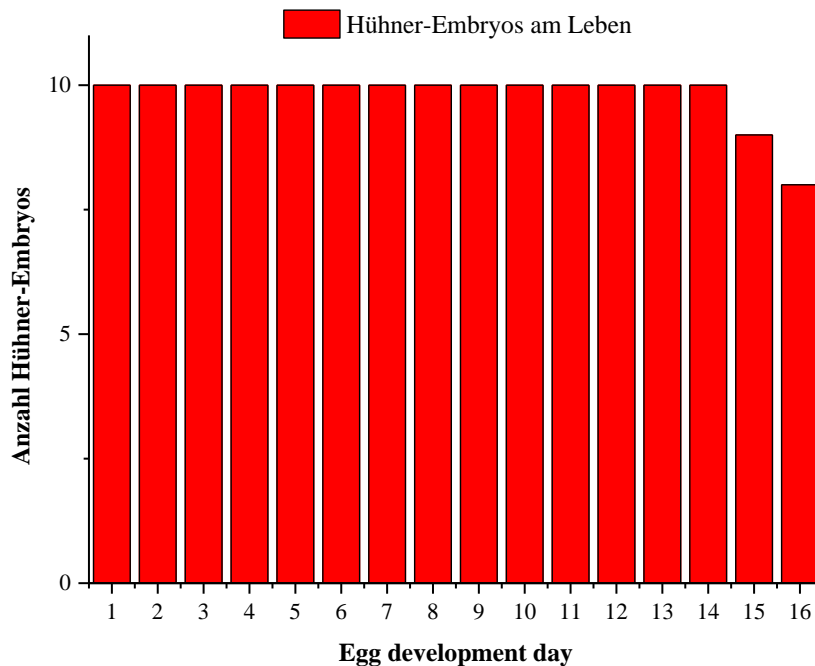


Abbildung 4.24: Evaluierung der Überlebensrate von Hühner-Embryos nach intravenöser Injektion von Tween 80/PBCA Nanopartikeln. An Tag 10 wurde injiziert.

4.3.2 Evaluierung über den MTT-Assay

Zur Untersuchung der Zytotoxizität wird als Standard der MTT-Assay verwendet. Die Methode ist unter 3.8.2 beschrieben und die Ergebnisse der Auswertung zeigt Abbildung 4.25. Die

Ausgangsprobe (Concentrated) hatte eine Konzentration von 8,1g/l Polybutylcyanoacrylat (PBCA). Dil. 1-15 stellen die einzelnen Verdünnungsschritte (1:1) dar, wodurch eine Endkonzentration von 0,00049438g/l PBCA bei Dil. 15 erreicht wurde. Ab Dil. 7 (0,127g/l PBCA) beginnt die Zellvitalität zu steigen und erreicht 32,1%. Weitere Verdünnungsschritte lassen die Vitalität bis auf ein Maximum von 99% bei Dil. 9 steigen, was einer Konzentration von 0,032g/l PBCA entspricht. Die anderen Verdünnungen wiesen danach alle wie erwartet eine Zellvitalität von 99% auf. Im Gegensatz dazu stand die 0,1% Triton X-100 Formulierung, welche eine stark erniedrigte Zellvitalität von 26,2% aufwies. Im Kontrast dazu stand die Blank-Probe, welche eine Vitalität von 96,7% zeigte.

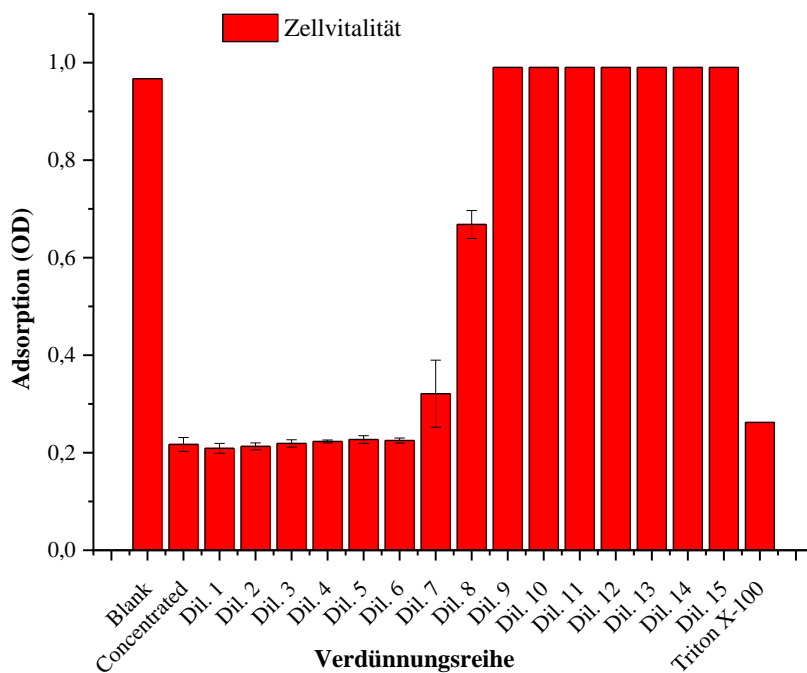


Abbildung 4.25: Auswertung des MTT-Assays. Blank ist die Negativkontrolle, Concentrated der Start der Verdünnungsreihe (8,1g/l PBCA), Dil. 1-15 die einzelnen Verdünnungsschritte und Triton X-100 diente als Positivkontrolle. Deutlich zu erkennen ist, dass ab der siebten Verdünnung die Vitalität der Zellen zunimmt und mit Dil. 9 (0,032g/l PBCA) ihr Maximum von 99% erreicht. Triton-X als Positivkontrolle wies eine Zellvitalität von 26,2% auf.

4.4 Ultraschallkontrastverstärkung

Die Fähigkeit der Ultraschallkontrastverstärkung wurde anhand des in 3.7.1 eigenhändig gebautem Modells untersucht. Die Nanobubbles wurden wie in 3.4.1 hergestellt und die Ergebnisse der Messung für SonoVue® und eine unbehandelten 2%igen Tween 80 Formulierung sind in Abbildung 4.26 bzw. 4.27 dargestellt. Zwischen den einzelnen Bildern liegen jeweils 2 Sekunden. Bei SonoVue® (Abbildung 4.26) ist ein deutlicher Anstieg an Kontrastverstärkung ab Bild C zu sehen, welcher bei Bild F sein Maximum erreichte und bis I wieder stetig abnahm. Bei der 2%igen Tween 80 Formulierung (Abbildung 4.27) zeigte sich ein ähnliches Bild. Der erste deutlichere Grauwertanstieg ist auf Bild D zu verzeichnen. Auf Bild G ist die Kontrastverstärkung am größten und nimmt bis Bild I wieder ab. Abbildung 4.28 vergleicht abschließend die mittleren Grauwerte der Nanobubbles mit dem von SonoVue® (100%). Keine der Nanobubble-Formulierungen erreichte über 50% Grauwertanstieg. Bei der 1%igen Tween 80 Formulierung konnte ein Anstieg von $34,91\% \pm 3,2\%$, für die 2% und 3%ige einer von $46,56\% \pm 2,87\%$ bzw. $43,94\% \pm 1,74\%$ und schließlich für die 4%ige Formulierung einer von $40,02\% \pm 11,7\%$ gemessen werden. Der mittlere Grauwert für die unbehandelte Formulierung, d.h. Tween 80 Nanobubbles und Microbubbles (Tween 80 NB+MB) erreichte hingegen einen Wert von $94,1\% \pm 3,2\%$.

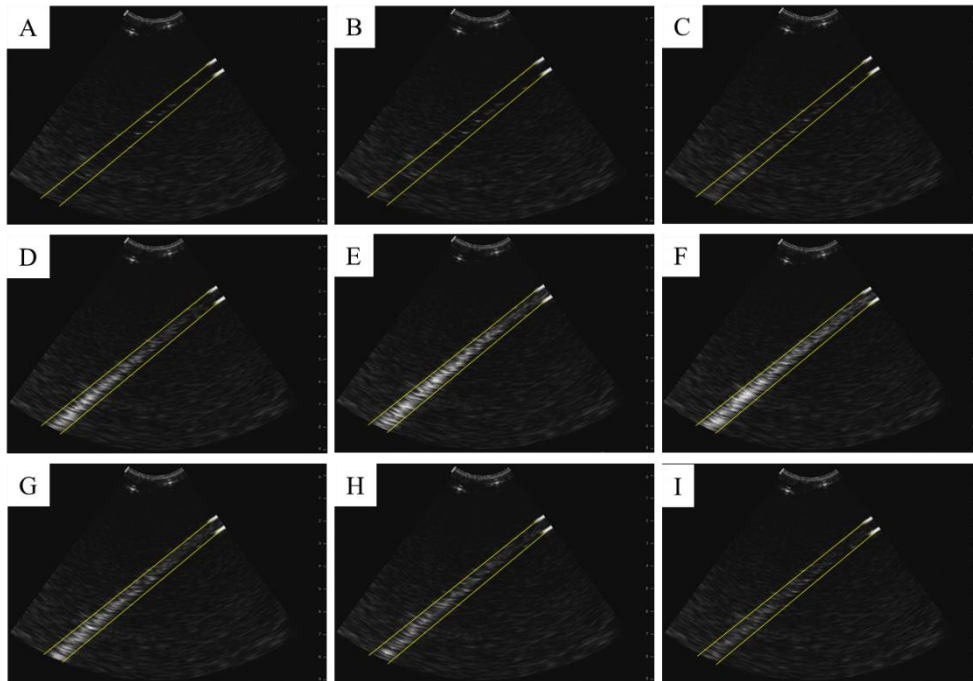


Abbildung 4.26: SonoVue® im Flussmodell, zwischen den einzelnen Bildern liegen jeweils 2 Sekunden. Bild C weist den ersten erkennbaren Anstieg des mittleren Grauwerts auf, bei Bild F erreicht er sein Maximum und nimmt von Bild G über H bis I ab.

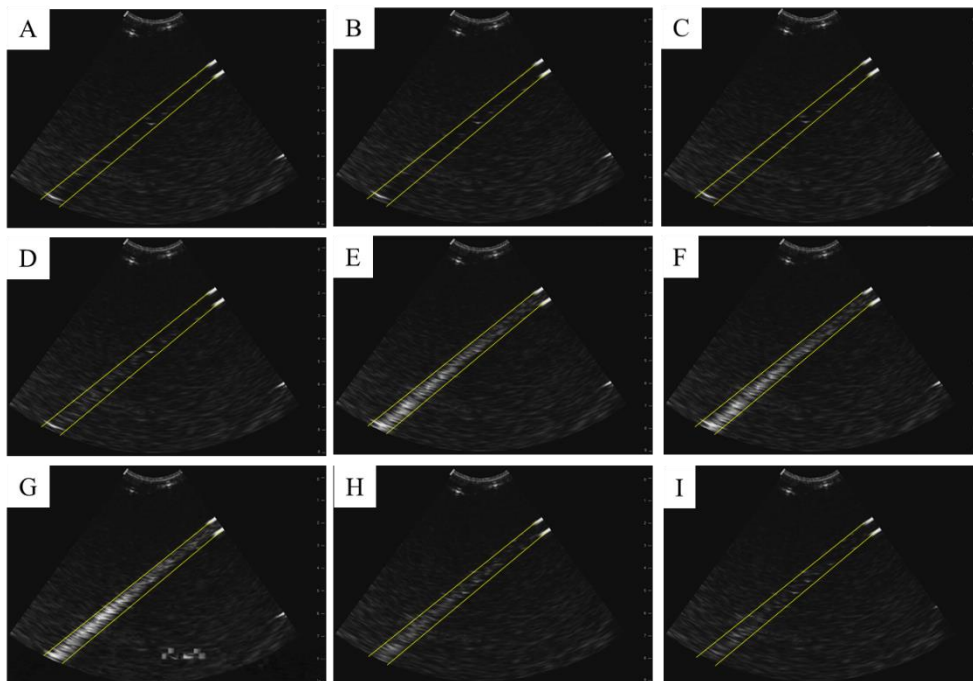


Abbildung 4.27: 2%ige Tween 80 Formulierung im Flussmodell, zwischen den einzelnen Bildern liegen jeweils 2 Sekunden. Bild D weist den ersten erkennbaren Anstieg des mittleren Grauwerts auf, bei Bild G erreicht er sein Maximum und nimmt von Bild H bis I wieder ab.

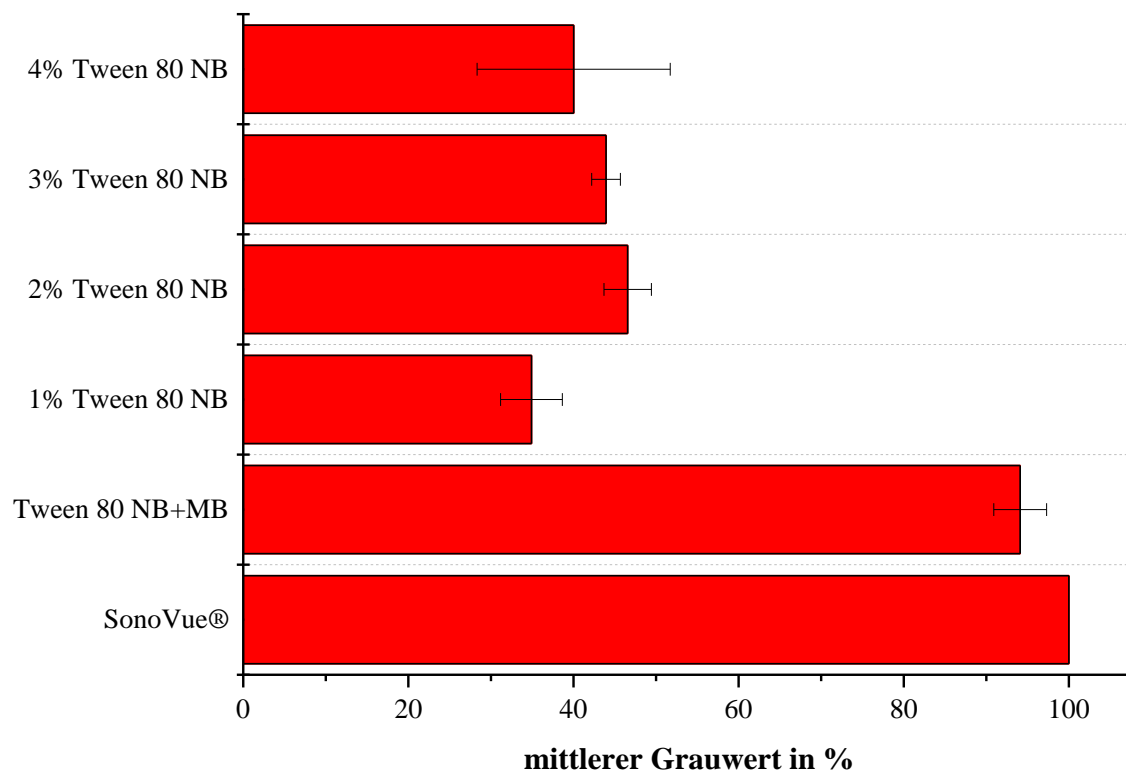


Abbildung 4.28: Vergleich des mittleren Grauwertanstiegs der Tween 80 Formulierungen mit SonoVue®. Keine der NB Formulierungen erreicht einen Wert über 47%. Die unbehandelte Probe (Tween 80 NB+MB) erreicht einen Wert von 94,1%.

5 Diskussion

Die erste Aufgabe der Arbeit bestand darin, polymerbasierte und tensidstabilisierte Nanopartikel herzustellen und diese vor Weiterverarbeitung hinsichtlich ihrer Eigenschaften zu untersuchen. In der Literatur ist die Herstellung von PBCA Nanopartikeln von verschiedenen Autoren beschrieben worden [105,139,140]. Die hergestellten Nanopartikelformulierungen hatten, nach dem Austausch des Tensids, durch DLS gemessene hydrodynamische Durchmesser von etwa 10nm. Je nach Tensidkonzentration variierten hierbei die Durchmesser der Nanopartikel. Zu beachten ist, dass sich mizellare Strukturen des Tensids über der CMC ausbilden können [141]. Die Mizellen von Tween 80 liegen ebenfalls in diesem Größenbereich. Die DLS [142] kann diesbezüglich keine abschließende Beurteilung liefern, jedoch weisen die erhöhten PDI's auf weitere Größenpopulationen hin, was durch eine grafische Auswertung bestätigt werden konnte. Tween 80 Mizellen sind in unveränderter Konzentration nicht in Populationen aufgeteilt, sondern befinden sich je nach Tensidkonzentration in einem engen Größenbereich. So müsste der PDI einer mizellaren Tween 80 Formulierung sehr klein sein. Dies konnte durch nicht aufgeführte Versuche bestätigt werden und ist an mehreren Stellen in der Literatur vermerkt [143,144]. Aufgrund der Erkenntnisse der grafischen Analyse der DLS-Messungen, konnte durch Ändern der Durchmesserermittlung (Volumen zu Anzahl) der Einfluss der großen Partikel auf die errechnete Größe minimiert werden, da der numerische Anteil an großen Partikel unter 1% lag. Einen weiteren Hinweis auf das Vorhandensein von Nanopartikel in diesem Größenbereich brachte die Tatsache mit sich, dass eine der Formulierungen eine Tensidkonzentration unter der mizellaren Konzentration des Tensids hatte. Die Sterilfiltration durch einen handelsüblichen Aufsteckfilter mit der Porengröße von 0,22µm hätte zwar die Tensidkonzentration örtlich (über der Filtermembran) erhöht, jedoch blieb die Konzentration des Tensids nach Filtration wieder unverändert unter der CMC. Endgültig beantwortete die Dispersionsanalyse diese erste strittige Frage. Bei dieser Methode wird durch Beschleunigung in einer optischen Zentrifuge das Sedimentation- bzw. Aufräumungsverhalten der Probe untersucht. Die Zentrifuge arbeitete mit 4000rpm. Eine Mizelle würde diese aufgebrachte zentrifugale Beschleunigung während der Messung mechanisch nicht aushalten. Die Auswertung der Dispersionsanalyse fand außerdem über einen Zeitraum von 24h statt, was einen zusätzlichen mechanischen Stress für die Mizellen

bedeutet hätte. Partikelsignale wurden jedoch über den gesamten 24 stündigen Zeitraum aufgenommen. Das Ausmessen der Partikel ergab einen mittleren Durchmesser von etwa $18,74\text{nm} \pm 5,34\text{nm}$. Eine abschließende Bewertung der Nanopartikel wurde mit dem AFM vorgenommen. Es eignet sich hervorragend um nanoskalige Strukturen zu visualisieren und zu vermessen. Die Auswertung der Bilder (Abbildung 4.9) zeigte deutliche Unterschiede zwischen Kern und Hülle. Das Phasenbild ist hierfür der ausschlaggebende Punkt. Es kann die Energiedissipation während der Interaktion von Spitze und Probe messen. Auf diese Weise lassen sich Materialunterschiede innerhalb der Probe erkennen. Das Phasenbild zeigt eine deutliche Hülle (als Ring dargestellt), welche etwas dunkler erscheint und einen Kern, welcher heller ist. Dies bestätigt das Vorhandensein von zwei verschiedenen Materialien. PBCA-Nanopartikel, welche durch ein Tensid stabilisiert sind, würden in dieser Form vorliegen. Bei der Vermessung der Größe fiel auf, dass die Ergebnisse abweichend von denen der beiden anderen Messmethoden waren. Alle durch das AFM vermessenen Partikel waren größer als durch DLS und analytische Zentrifuge ermittelt. Das liegt daran, dass die PBCA Partikel auf der Oberfläche spreiten, was ihren gemessenen geometrischen Durchmesser vergrößert. Hierbei fällt für die 4%ige Tween 80 Formulierung auf, dass die Partikel etwa 40nm größer waren. Jedoch lässt sich dieses Phänomen anhand der Abbildung 4.9 Bild D erklären. Das eingesetzte Tensid überzieht die Probe nahezu vollständig, wodurch eine Vermessung von einzelnen unter dem Tensid befindlichen Strukturen sehr schwierig ist, da die gespreitete Ebene vergrößert wird.

Die zweite Aufgabe, die Herstellung und Charakterisierung der Nanobubbles, folgte im Anschluss an die Herstellung der Nanopartikel. Eine Herstellung von PBCA MB ist in der Literatur an mehreren Stellen beschrieben [145-147], jedoch ist die Herstellung von PBCA Nanobubbles aufgrund von mehreren Faktoren äußerst schwierig. Die freie Gibbsche Energie ist durch die geringe Größe der Nanobubbles sehr hoch. Ein Zusammenfließen dieser Nanobubbles zu größeren Bubbles würde die freie Gibbsche Energie des Systems deutlich reduzieren und deswegen als Zustand bevorzugt werden. Die Größe ist doppelt kritisch zu sehen, da sie auch in den LaPlace Druck eingeht. Bei Reduktion des Radius, erhöht sich gleichzeitig der LaPlace Druck im Innenraum der Bubbles im Vergleich zum äußeren Medium. Umso höher dieser Druckunterschied ist, desto instabiler sind die Bubbles in Lösung. Dennoch deuteten die Messungen der Laserdiffraktometrie in der unbehandelten Probe auf das Vorhandensein von

Nanobubbles in den Formulierungen hin. Dies schließt auf eine erfolgreiche Herstellung von nanoskaligen gasgefüllten Polymerpartikeln und konnte nach dem Aufreinigen der Proben bestätigt werden. Alle vier Formulierungen zeigten nach dem Aufreinigen nanoskalige Fraktionen, jedoch waren diese nach 10min nicht mehr messbar. Dieser Zerfall der nanoskaligen Fraktionen bestätigt die Annahmen bezüglich der physikalischen Parameter. Der LaPlace Druck im Innenraum der Nanobubbles ist sehr groß, da der Radius des Gasraums klein ist. Jedoch kann damit die Annahme über einen Gaseinschluss im Innern des Polymerpartikels bestätigt werden. Die Wiederholungsmessung fand nach 10min statt. Nanobubbles unterliegen dem Zerfall aufgrund der oben genannten Gesetzmäßigkeiten. Solide, feste PBCA Partikel, wie sie bei der Herstellung auch hätten entstehen können, wären nach 10min nicht zerfallen und müssten immer noch detektierbar sein. Eine weitere Möglichkeit einer Stabilisierung (außer durch PBCA und Tensid) von Nanobubbles besteht darin, die elektrostatischen Anziehung- bzw. Abstoßungskräfte zwischen Partikeln zu nutzen, folglich das Zetapotential zu erniedrigen. Dies wurde für Sauerstoff-Nanobubbles gezeigt und konnte durch ein Senken des Zetapotential erreicht werden [148]. Dieses Ergebnis konnte für die 2%ige Formulierung bestätigt werden. Das Zetapotential sank nach Zugabe kleiner Menge NaCl auf unter -10mV, gleichzeitig konnte eine Stabilisierung der Nanobubbles beobachtet werden und eine erfolgreiche Vermessung nach 10min war möglich. Die Erniedrigung des Zetapotential beruht auf der Anlagerung der Ionen und der Erhöhung der Potentialdifferenz zum Medium. Die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen den Nanobubbles werden größer, ein Zusammenfließen wird erschwert. Bei weiterer Zugabe von NaCl konnte keine Abnahme, sondern eine Zunahme des Zetapotential beobachtet werden. Diese ist durch die Debye-Länge zu erklären, die mit Erhöhung der NaCl-Konzentration abnimmt.

Die Ergebnisse der Visualisierung mit dem AFM stimmen mit denen der Messung der Nanopartikel überein. Die Energiedissipation [149], die im Phasenbild gemessen werden konnte, zeigt wieder zwei unterschiedliche Materialien ähnlicher Anordnung, eines umhüllte das andere. Zudem erkennt man auf den Bildern (Abbildung 4.15 Bild E) deutlich, wie die Nadel die Hülle beim Vermessen aufgerissen hat. Das zweite Material kommt unter dem ersten zum Vorschein und zeugt von einem mit Tensid umhüllten Partikel (PBCA und Tween 80).

Eine gute Visualisierung wird im REM durch Bedampfen der Proben mit einer wenige Nanometer dünnen Schicht aus Gold erreicht [150]. Diese Probenvorbereitung erfordert ein

angelegtes Vakuum, damit die Goldcluster nicht abgelenkt werden. Ein solches Vakuum würde die Nanobubbles implodieren lassen. Die Bilder Abbildung 4.20 und 4.21 deuten auf Bild A (6000x) auf diese Implosion hin. Durch die feste PBCA-Hülle und den luftgefüllten Raum wäre eine ringförmige Struktur entstanden. Bild B und C zeigen deutlich die 250-400nm großen Donut-artigen Strukturen und ringförmige Partikel.

Die Bilder der TEM bestätigen die Annahmen der AFM Messung bezüglich der Hülle und des Kerns. Auf Abbildung 4.18 Bild B ist deutlich ein etwa 250nm großes Nanobubble zu sehen, welches von zusammengelaufenem Tensid umgeben ist. Die Bilder weisen keine Donut-artigen Strukturen auf, da die Probe vor Einbringen in den Probenraum fixiert wurde. Die Möglichkeit des Vorhandenseins solider Partikel ist durch diese Methoden nicht ausgeschlossen, da eine Visualisierung des eingeschlossenen Gases auf diese Weise nicht möglich ist. Diesen Beweis lieferte die lichtmikroskopische Untersuchung der Bubbles. Das „Funkeln“ der Nanobubbles, dass zu erkennen war, kommt von einem Phasenkontrast. Trifft das Licht des Mikroskops auf die Grenzfläche zwischen dem Dispersionsmedium und der Luft im Inneren, so wird ein Teil des Lichts zurückgestrahlt und als „funkeln“ wahrgenommen. Nanobubbles haben zwischen dem Dispersionsmedium und dem gasgefüllten Innenraum eine Phasengrenze, woran dieses Phänomen auftreten könnte. Solide Partikel würde das Licht nicht reflektieren.

Zusammen deuten alle Ergebnisse auf eine erfolgreiche Herstellung eines nanoskaligen, gasgefüllten Polymerpartikels (Nanobubbles) hin. Eine Beurteilung der „Qualität“ dieser Nanobubbles wurde als letztes durch die Messung der Ultraschallkontrastverstärkung vorgenommen. Eine gute Ultraschallkontrastverstärkung kommt zustande, wenn möglichst viel des einfallenden Schalls wieder reflektiert und somit zur Bildgebung genutzt werden kann. Die Menge an Schall, die maximal von den Nanobubbles im Vergleich zu SonoVue® reflektiert wurde, betrug 47,1%. SonoVue® ist eine liposomale Formulierung mit Bubblegrößen von 2- 6µm [151]. Die Impedanzflächen dieser Formulierung sind um ein vielfaches größer als die der Nanobubbles, dadurch ist die reflektierte Schallmenge größer, das Signal heller und somit der mittlere Grauwert höher.

Zum Abschluss sollte sich eine Formulierung, die im menschlichen Körper angewandt wird, durch höchste Biokompatibilität ausweisen. Aus diesem Grund war ein Austausch des Tensid Triton X-100 unumgänglich. Triton X-100 ist ein bekanntes Zellgift und weist bereits starke

Toxizität im millimolaren Bereich auf [152]. Tween 80 ist kommerziell gebräuchlich und hat eine letale Dosis von $>20.000\text{mg/kg}$. Im MTT-Assay zeigten die Formulierungen eine sehr gute Verträglichkeit des PBCA in Konzentrationen, die in der klinischen Anwendung sinnvoll wären. Eine weitere biologische Verträglichkeitsevaluierung konnte durch das CAM-Modell [153] gemacht werden. An EDD 10 wurden zehn Eiern die Formulierungen injiziert. Über die sechs folgenden Untersuchungstage konnte kein nennenswerter Einfluss auf die Überlebensrate der Hühnerembryos beobachtet werden. Alle Embryos entwickelten sich normal, sodass eine gute biologische Verträglichkeit der neuen Formulierung auf alle Organismen bestätigt werden konnte.

6 Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Zusammenfassung

Bildgebende Verfahren sind heutzutage in der Medizin die wichtigsten diagnostischen Werkzeuge um Erkrankungen wie z.B. Krebs, Atherosklerose oder Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems frühzeitig zu erkennen und schnell zu lokalisieren. Ein etabliertes und effizientes Verfahren in diesem Bereich stellt hierbei die Ultraschalldiagnostik dar. Bei dieser Technik werden Schallwellen von einem Ultraschallkopf ausgehend, nichtinvasiv durch das zu untersuchende Gewebe gesendet und selektiv reflektiert. Die reflektierten Schallwellen nutzt man im Anschluss zur Erzeugung von Bildern und der Diagnose des Krankheitsbildes. Ultraschallkontrastmittel können hierbei durch eine Kontrastverstärkung erheblich zur Verbesserung der Bildgebung beitragen. Eine weitere Eigenschaft solcher kontrastverstärkender Diagnostika ist das Visualisieren von bestimmten Zielstrukturen. Gerade bei der Umsetzung solcher moderner Bildgebungsverfahren spielen die Größe der Kontrastmittel sowie deren biologische Eigenschaften, wie die Biokompatibilität der verwendeten Materialien eine entscheidende Rolle. Kommerzielle Ultraschallkontrastmittel werden derzeit aus Lipiden, Proteinen und Polymeren hergestellt. Die Stoffklasse der Polymere eignet sich besonders zur Entwicklung neuartiger Ultraschallkontrastmittel. Die Vorteile polymerer Materialien sind die große Breite an bekannten Substanzklassen mit vielseitigen physikalischen und chemischen Eigenschaften, welche zudem gezielt beeinflusst werden können. So ist es möglich Polymere z.B. bezüglich ihrer Dichte, ihres Schmelzpunkts und ihrer elektrischen Leitfähigkeit anzupassen und zu modifizieren. Einfluss hierauf haben z.B. die Wahl der eingesetzten Monomere, die Zusammensetzung und Wechselwirkungen der Kettensegmente oder der Grad der Polymerisierung. Auch bei den Polymerisierungsreaktionen sind unterschiedlichste Verfahren etabliert, z.B. findet die Polymerisation bei Polyestern, Polyamiden und Polyurethanen über eine sehr gut steuerbare Stufenreaktion statt. Hierbei wächst das Polymer Stufenweise, in definierten Abschnitten durch Anfügen von Monomeren. Bei der Kettenwachstumsreaktion, welche bei olefinischen ungesättigten Verbindungen angewendet wird, wächst das Polymer über die Kette weiter. Alle Verfahren können auch zur Formulierung von ultraschallaktiven Diagnostika herangezogen werden.

Das vorrangige Ziel der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich ausführlich mit dem Problem der Herstellung und Charakterisierung eines neuartigen Ultraschallkontrastmittels auf Polymerbasis, welches sich durch eine nanoskalige Größe, Biokompatibilität und optimale Kontrastverstärkung auszeichnet. n-Butylcyanoacrylat (Histoacryl®) wurde hier als Monomer zur Polymerherstellung und Polysorbat 80 (Tween 80) als Schutzkolloid zur Einstellung der Größe bzw. zur Stabilisierung genutzt. Der erste Schritt befasste sich mit der Herstellung der Polymerpartikel, welche in einem speziellen Reaktor, unter definierten Bedingungen polymerisiert wurden. Anschließend erfolgte die eingehende physikalisch-chemische Charakterisierung der Partikeldispersionen mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung (DLS), der Dispersionsanalyse, sowie der Laser-Doppler-Anemometrie. Mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie konnten die Partikel visualisiert und die Gestalt ermittelt werden. Die hergestellten Polymernanopartikel zeigten mittels DLS gemessene Durchmesser zwischen 8-12nm und Zetapotentiale von -6mV bis -8mV. Die 2%ige Tween 80 Formulierung erwies sich hierbei als die mit den kleinsten Partikeln und niedrigsten Zetapotential. Die folgende Dispersionsanalyse zeigte einen deutlichen Sedimentationsprozess, was das Vorhandensein unterschiedlicher Partikelpopulationen nahelegt. Dies konnte auch durch die Transmissionsänderung (Trübungsmessungen) bestätigt werden.

Durch die Visualisierung mittels Rasterkraftmikroskop konnte ein tieferer Einblick in die Morphologie der Polymerpartikel erhalten und deren Größe bestätigt werden. Das Phasenbild zeigte deutliche Unterschiede der viskoelastischen Materialeigenschaften zwischen Hülle und Kern der Partikel. Eine nahe liegende Erklärung wird durch das Modell gegeben, das die eher harten Polymerpartikel vom „weichen“ Tensid (Schutzkolloid) umhüllt vorliegen. Die Durchmesser der Partikel bewegten sich im Bereich von 20-50nm. Der visualisierte Durchmesser ist gegenüber den DLS Messungen leicht vergrößert, was als Folge der Oberflächenwechselwirkungen Partikel/Objekträger angesehen werden kann. Der zweite und technologisch komplexere Abschnitt der Arbeit, beschäftigte sich mit der Herstellung der Ultraschallkontrastmittel aus den Polymerpartikeln. Hierzu wurden die nanoskaligen Polymerpartikel als Basissysteme zur Herstellung Luft gefüllter Ultraschallkontrastmittel verwendet, bei denen sie als Schutzkolloide vergleichbar den bekannten „Pickering“ Systemen eingesetzt werden. Die Herstellung des nanoskaligen Ultraschallkontrastmittels (sogenannte Nanobubbles) erfolgte durch den Eintrag von Ultraschall mittels eines Ultraschall-

Homogenisators (Stabhomogenisator). In Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen konnten kleine Luftblasen durch die polymeren Nanopartikel eingeschlossen und stabilisiert werden. Die so hergestellten Mikro- und Nanobubbles wurden im Anschluss mit Hilfe einer Hamiltonspritze fraktioniert und weiter mittels DLS vermessen. Die gemessenen Durchmesser betrugen zwischen 200-800nm. Jedoch zeigten alle gemessenen Formulierungen eine geringe Lagerstabilität was durch eine starke Durchmesserzunahme auf Mikrometergröße (2800-3500µm) gekennzeichnet war. Durch Zugabe von verschiedenen NaCl-Konzentrationen konnte eine Stabilitätserhöhung erreicht werden.

Die anschließende ausführliche Visualisierung der Nanobubbles erfolgte mittels ebenfalls Rasterkraftmikroskopie, sowie Rasterelektronenmikroskopie, Transmissionselektronenmikroskopie und Phasenkontrast-Lichtmikroskopie. Die Rasterkraftmikroskopie zeigte wiederum deutliche Unterschiede zwischen Hülle und Kern. Bei der Rasterelektronenmikroskopie waren Torus-artige Strukturen zu sehen. Dies ist auf die Implosion der Partikel bei der Probenvorbereitung unter Vakuum zurückzuführen und bestätigte das Vorhandensein von Gas im Innenraum der Nanobubbles. Die Transmissionselektronenmikroskopie zeigte deutlich Tensid umhüllte Strukturen im Bereich von etwa 250nm. Die Lichtmikroskopie wurde als abschließende Visualisierungstechnik genutzt. Hierbei war ein „funkeln“ der Nanobubbles unter dem Mikroskop zu vernehmen, was auf einen Phasenunterschied zurückzuführen ist und der die Annahme des gasgefüllten Innenraums bestätigte.

Die Untersuchung der Biokompatibilität wurde mit Hilfe des CAM-Modell (Chorioallantoismembran Modell) und MTT-Assay vorgenommen. Das CAM-Modell dient als Alternative zum Tiermodell und zeigte keinerlei schädliche Wirkung auf die Hühnerembryos. Bis EDD 14 (Egg development day), d.h. 4 Tage nach Injektion der Untersuchungslösung haben alle Hühnerembryos überlebt. Beim MTT-Assay konnte ab einer Partikelkonzentration von 0,032g/l PBCA ein Zellüberlebensrate von 99% erreicht werden.

Die Messung der Kontrastverstärkung diente zur Evaluierung der Effektivität des Ultraschallkontrastmittels. Hierfür wurden die Formulierungen in einem eigens angefertigten Modell untersucht und mit dem kommerziellen SonoVue® verglichen. Dabei erreichte die 2%ige Tween 80 Formulierung die beste Kontrastverstärkung (46,56%±2,87% im Vergleich zu

SonoVue®). Dieser im Vergleich niedrige Wert ist unter Berücksichtigung der Größe und Stabilität dennoch ein hervorragendes Ergebnis.

Die bildgebende Diagnostik ist das vermeintlich wichtigste Werkzeug in der Krankheitserkennung und –bekämpfung. Dabei wird es immer wichtiger gezielt Strukturen zu erreichen oder in sie vorzudringen, wodurch neue Anforderungen an unsere bestehenden Kontrastmittel gestellt werden. Diese Dissertation beschreibt die Herstellung und Charakterisierung eines solchen Kontrastmittels, welches diesen neuen Anforderungen gewachsen sein könnte und bezüglich seiner Biokompatibilität hervorragende Ergebnisse aufweist.

6.2 Ausblick

Die dargestellten Ergebnisse konnten zeigen, dass es möglich ist schallaktive nanoskalige Polymere (200-400nm) herzustellen und zu charakterisieren. Die Forschung auf diesem Gebiet ist noch jung [154]. Dennoch ist es vorstellbar, Nanobubbles bei weiterer Stabilisierung zur Ultraschall Diagnostik zu nutzen. Zum Beispiel wäre eine Akkumulation aufgrund des EPR-Effekts bei ausreichender Stabilität denkbar. Eine mögliche Anwendung wäre die Verwendung bei Hirnoperationen. Nanobubbles würden sich wegen ihrer Größe in fenestrierten Geweben (z.B. Tumorgewebe) ansammeln und dieses dadurch sichtbar machen. Eine aufwendige Tomographie wäre überflüssig. Die Verwendung als Transportsystem zum aktiven oder passiven zielgerichteten Transport könnte darüber hinaus näher untersucht werden [155]. Polymere sind gute Arzneistoffträgersysteme, welche mit verschiedensten Arzneistoffen beladen werden können. Zudem erlaubt die Struktur eine leichte und gute Modifizierung, wodurch Ankermoleküle für einen aktiven zielgerichteten Transport genutzt werden könnten. Weiterhin erwähnenswert ist die Möglichkeit der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke [156]. Neueste Erkenntnisse beschreiben einen verbesserten Transport von Wirkstoffen durch Nanobubble-Formulierungen über die Blut-Hirn-Schranke, welche heutzutage immer noch für viele Arzneistoffe eine unüberwindbare Barriere darstellt.

6.3 Summary

Today, imaging procedures in medicine are the most important diagnostics to recognize and locate diseases e.g. cancer, atherosclerosis or diseases of the cardiovascular system. Ultrasound diagnostics is an established and efficient procedure in this field. This technique uses sound waves, which are transmitted by an ultrasound head and sent non-invasively through the tissue where they are selectively reflected. The reflected sound waves are detected and used to generate images and diagnose diseases.

Ultrasound contrast agents can significantly improve imaging by providing contrast enhancement. Another benefit of such contrast-enhancing diagnostics is the visualization of target structures. Thus, the size of the contrast agents as well as their biological properties e.g. biocompatibility play a crucial role. Currently, commercially available ultrasound contrast agents are made from lipids, proteins or polymers. Polymers are particularly suitable for the development of novel ultrasound contrast agents. The advantages of polymeric materials are the wide range of known compounds with versatile physical and chemical properties combined with the possibility of manufacturing specific tailor made structures. So it is possible to adapt and modify polymers regarding density, melting point and electrical conductivity. These properties can be influenced by e.g. the choice of the monomer, the composition and interactions of the chain segments or the degree of polymerization. Furthermore, a variety of different polymerization reactions are established. In case of polyesters, polyamides and polyurethanes, the polymerization takes place via controlled chemical multi-step reaction. Therefore, the polymer grows stepwise by adding monomers. The chain growth reaction for olefinic unsaturated compounds, takes place over a continued prolongation. All methods can be used for the formulation of ultrasound-active diagnostic agents.

The primary objective of this work was the preparation and characterization of a novel polymer-based ultrasound-active contrast agent characterized by their nanoscaled size, biocompatibility and good contrast enhancement. Therefore, n-Butyl cyanoacrylate (Histoacryl®) was used monomer for polymer production and Polysorbate 80 (Tween 80) served as the surfactant for controlling the particle size and for stabilization. The first step involved the preparation of the polymer particles in a specific reactor under defined conditions. Subsequently, detailed physicochemical characterization of the particle dispersions was carried out using dynamic light

scattering (DLS), dispersion analysis and laser Doppler anemometry. Using atomic force microscopy, the particles could be visualized and their by size and shape could be determined. The prepared polymeric nanoparticles showed hydrodynamic diameters between 8-12nm and zeta potentials of -6mV to -8mV. The 2% Tween 80 formulation has been proven to be the one with the smallest particles and lowest zeta potential. The following dispersion analysis showed a significant sedimentation process, indicating the presence of different particle size populations. This could be also confirmed by the change in transmission over time in turbidity measurements.

Visualization using an atomic force microscope provided a deeper insight into the morphology of the polymeric particles and confirmed their size. The phase image showed significant differences in the viscoelastic material properties between shell and core of the particles. An obvious explanation is given by the model that the rather hard polymer particles are coated with the "soft" surfactant (protective colloid). The diameter of the measured particles was in the range of 20-50nm. In fact, the visualized diameter is slightly increased compared to the DLS measurements, due to can be assumed particle/slide surface interactions. The second and technologically more complex chapter of the dissertation dealt with the preparation of the ultrasound contrast agents. For this purpose, the nanoscale polymer particles were used as the starting point for the production of air-filled ultrasound contrast agents in which they are used as protective colloids comparable to the known "Pickering" systems. The preparation of the nanoscale ultrasound contrast agent (so-called nanobubbles) was carried out by the application of ultrasound via an ultrasonic homogenizer (bar homogenizer). Depending on the ambient conditions, small air bubbles could be encapsulated and stabilized by the polymeric nanoparticles. Afterwards, the produced micro- and nanobubbles were separated using a Hamilton syringe and further determined by DLS. The measured diameters were between 200-800nm. However, all measured formulations showed a low storage stability. This has been observed as a large diameter increase (2800-3500 μ m) over time. By adding different NaCl concentrations an improved stability could be achieved.

The following detailed visualization of the nanobubbles was carried out by atomic force microscopy, as well as scanning electron microscopy, transmission electron microscopy and phase-contrast light microscopy. Again, atomic force microscopy revealed clear differences

between shell and core. Scanning electron microscopy showed toroidal structures, due to implosion of the particles during sample preparation under vacuum. This confirmed the presence of gas inside the nanobubbles. Transmission electron microscopy clearly showed surfactant-coated structures in the range of about 250nm. Light microscopy was used as a final visualization technique. At this, a "glimmer" of the nanobubbles could be detected under the microscope, which indicates a phase, confirming the assumption of a gas-filled core. Biocompatibility testing was performed using the chorio-allantoic membrane model (CAM-Model) and MTT assay. The CAM model serves as an alternative to the animal model and showed no harmful effect on chicken embryos. On EDD 14 (Egg development day), i.e. four days after injection of the test solution, all chicken embryos survived. In the MTT assay, a cell survival rate of 99% could be observed from a particle concentration of 0.032g/l PBCA. The measurement of contrast enhancement was used to evaluate the effectiveness of the ultrasound contrast agent. For this purpose, the formulations were investigated in a custom build model and compared to the commercially used SonoVue®. The 2% Tween 80 formulation achieved the best contrast enhancement ($46.56\% \pm 2.87\%$ compared to SonoVue®). This relatively low value is nevertheless an excellent result considering the size and stability.

Imaging diagnostics is the most important tool detection and evaluating diseases. At the same time, it has become more and more important to reach specific targets. This defines new requirements to our existing contrast agents. This dissertation describes the preparation and characterization of a contrast agent, which copes with these new requirements and shows excellent biocompatibility.

7 Literaturverzeichnis

1. Tubiana, Maurice (1996): Wilhelm Conrad Rontgen and the discovery of X-rays.
2. Tiner, John Hudson (1999): Exploring the History of Medicine. From the Ancient Physicians of Pharaoh to Genetic Engineering. Green Forest: New Leaf Publishing Group Inc. Online verfügbar unter <http://gbv.ebiblib.com/patron/FullRecord.aspx?p=1868984>.
3. Krohmer, Jack S. (1989): Radiography and fluoroscopy, 1920 to the present. In: *Radiographics* 9 (6), S. 1129–1153.
4. Bradley, William G. (2008): History of medical imaging. In: *Proceedings of the American Philosophical Society* 152 (3), S. 349–361.
5. Heywang-Köbrunner, Sylvia H.; Schreer, Ingrid (1996): Bildgebende Mammadiagnostik. Untersuchungstechnik, Befundmuster und Differentialdiagnostik in Mammographie, Sonographie und Kernspintomographie; 15 Tabellen: Thieme.
6. Ahn, Hye Shin; Kim, Sun Mi; Jang, Mijung; La Yun, Bo; Kim, Bohyoung; Ko, Eun Sook et al. (2014): A new full-field digital mammography system with and without the use of an advanced post-processing algorithm. mparison of image quality and diagnostic performance. In: *Korean journal of radiology* 15 (3), S. 305–312.
7. Buzug, Thorsten M. (2011): Einführung in die Computertomographie. Mathematisch-physikalische Grundlagen der Bildrekonstruktion: Springer-Verlag.
8. Reiser, Maximilian; Semmler, Wolfhard (2013): Magnetresonanztomographie: Springer-Verlag.
9. Windecker, Stephan; Meier, Bernhard (2002): X-Ray Coronary Angiography. In: *Pan Vascular Medicine*: Springer, S. 602–635.
10. Zappacosta, Anthony R.; Perras, Susan T.; Closkey, Gregory M. (1991): Seldinger technique for Tenckhoff catheter placement. In: *ASAIO Journal* 37 (1), S. 13–15.
11. Greitz, Torgny (1999): Sven-Ivar Seldinger. In: *American Journal of Neuroradiology* 20 (6), S. 1180–1181.

12. Elser, H. (2003): Leitfaden Nuklearmedizin. Praktische Anleitung und Prüfungswissen für Medizinisch-Technische Assistenten in der Radiologie (MTAR). Zweite, überarbeitete und erweiterte Auflage. Heidelberg, s.l.: Steinkopff. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-12259-4>.
13. Shukla, A. K.; Kumar, Utham (2006): Positron emission tomography. An overview. In: *Journal of medical physics* 31 (1), S. 13–21. DOI: 10.4103/0971-6203.25665.
14. Miele, Evelina; Spinelli, Gian Paolo; Tomao, Federica; Zullo, Angelo; Marinis, Filippo de; Pasciuti, Giulia et al. (2008): Positron Emission Tomography (PET) radiotracers in oncology—utility of 18F-Fluoro-deoxy-glucose (FDG)-PET in the management of patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC). In: *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 27 (1), S. 52.
15. Evan, Y. Yu; Muzi, Mark; Hackenbracht, Joy A.; Rezvani, Brian B.; Link, Jeanne M.; Montgomery, Robert Bruce et al. (2011): C11-acetate and F-18 FDG PET for men with prostate cancer bone metastases. Relative findings and response to therapy. In: *Clinical nuclear medicine* 36 (3), S. 192.
16. Knaapen, P.; Haan, S. de; Hoekstra, O. S.; Halbmeijer, R.; Appelman, Y. E.; Groothuis, J. G.J. et al. (2010): Cardiac PET-CT. Advanced hybrid imaging for the detection of coronary artery disease. In: *Netherlands Heart Journal* 18 (2), S. 90–98.
17. Lou, Hans C.; Kjaer, Troels W.; Friberg, Lars; Wildschiodtz, Gordon; Holm, Søren; Nowak, Markus (1999): A 15O-H2O PET study of meditation and the resting state of normal consciousness. In: *Human brain mapping* 7 (2), S. 98–105.
18. Chatal, Jean-François; Rouzet, François; Haddad, Ferid; Bourdeau, Cécile; Mathieu, Cédric; Le Guludec, Dominique (2015): Story of rubidium-82 and advantages for myocardial perfusion PET imaging. In: *Frontiers in medicine* 2.
19. Ghotbi, Adam A.; Kjær, Andreas; Hasbak, Philip (2014): comparison of PET rubidium-82 with conventional SPECT myocardial perfusion imaging. In: *Clinical physiology and functional imaging* 34 (3), S. 163–170.

20. Bares, R.; Dohmen, B. M.; Cremerius, U.; Fass, J.; Teusch, M.; Büll, U. (1996): Ergebnisse der Positronen-emissionstomographie mit Fluor-18-markierter Fluordesoxyglukose bei Differentialdiagnose und Staging des Pankreaskarzinoms. In: *Der Radiologe* 36 (5), S. 435–440.
21. Kwee, Thomas C.; Basu, Sandip; Alavi, Abass (2011): PET and PET/CT for unknown primary tumors. In: *Positron Emission Tomography*, S. 317–333.
22. Antoch, Gerald; Vogt, Florian M.; Freudenberg, Lutz S.; Nazaradeh, Fridun; Goehde, Susanne C.; Barkhausen, Jörg et al. (2003): Whole-body dual-modality PET/CT and whole-body MRI for tumor staging in oncology. In: *Jama* 290 (24), S. 3199–3206.
23. Hany, Thomas F.; Steinert, Hans C.; Goerres, Gerhard W.; Buck, Alfred; Schulthess, Gustav K. von (2002): PET diagnostic accuracy. Improvement with in-line PET-CT system: initial results. In: *Radiology* 225 (2), S. 575–581.
24. Beyer, Thomas; Townsend, David W.; Brun, Tony; Kinahan, Paul E. (2000): A combined PET/CT scanner for clinical oncology. In: *The Journal of nuclear medicine* 41 (8), S. 1369.
25. Czernin, Johannes; Allen-Auerbach, Martin; Schelbert, Heinrich R. (2007): Improvements in cancer staging with PET/CT. Literature-based evidence as of September 2006. In: *The Journal of nuclear medicine* 48 (1 suppl), 78S-88S.
26. Bull, James (1980): The history of computed tomography. In: *Computerized tomography*.
27. Bücheler, Egon; Lackner, Klaus-Jürgen; Thelen, Manfred (2005): Einführung in die Radiologie: Thieme Verlag.
28. Hu, Hui; He, H. David; Foley, W. Dennis; Fox, Stanley H. (2000): Four multidetector-row helical CT. Image quality and volume coverage speed. In: *Radiology* 215 (1), S. 55–62.
29. Saltzherr, T. P.; Goslings, J. C. (2009): Total body CT scan as the primary diagnostic modality in multi-trauma patients. In: *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde* 153, A982-A982.

30. Tan, Jessica C.; Dillon, William P.; Liu, Songling; Adler, Felix; Smith, Wade S.; Wintermark, Max (2007): Systematic comparison of perfusion- CT and CT- angiography in acute stroke patients. In: *Annals of neurology* 61 (6), S. 533–543.
31. Shrier, David A.; Tanaka, Hisashi; Numaguchi, Yuji; Konno, Shoko; Patel, Uresh; Shibata, Dean (1997): CT angiography in the evaluation of acute stroke. In: *American Journal of Neuroradiology* 18 (6), S. 1011–1020.
32. Jayaraman, Mahesh V.; Mayo-Smith, William W.; Tung, Glenn A.; Haas, Richard A.; Rogg, Jeffrey M.; Mehta, Neerav R.; Doberstein, Curtis E. (2004): Detection of intracranial aneurysms. Multi-detector row CT angiography compared with DSA. In: *Radiology* 230 (2), S. 510–518.
33. Villablanca, J. Pablo; Jahan, Reza; Hooshi, Parizad; Lim, Silvester; Duckwiler, Gary; Patel, Aman et al. (2002): Detection and characterization of very small cerebral aneurysms by using 2D and 3D helical CT angiography. In: *American Journal of Neuroradiology* 23 (7), S. 1187–1198.
34. Westerlaan, Henriëtte E.; van Dijk, J. M.C.; Jansen-van der Weide, Marijke C.; Groot, Jan Cees de; Groen, Rob J. M.; Mooij, Jan Jakob A.; Oudkerk, Matthijs (2011): Intracranial aneurysms in patients with subarachnoid hemorrhage. CT angiography as a primary examination tool for diagnosis—systematic review and meta-analysis. In: *Radiology* 258 (1), S. 134–145.
35. Kumar, Anil (2014): History of MRI. In: *Journal of the Indian Institute of Science* 94 (4), S. 363–370.
36. Baudendistel, K. T.; Heverhagen, J. T.; Knopp, M. V. (2004): Klinische MRT bei 3 Tesla. Aktueller Stand. In: *Der Radiologe* 44 (1), S. 11–18.
37. Köchli, Victor D.; Marincek, Borut (2013): Wie funktioniert MRI? Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung: Springer-Verlag.
38. Ambach, Walter (1989): Physikalische Prinzipien bildgebender Systeme in der Medizin. In: *Berichte des Naturwissenschaftlich-medizinischen Vereins in Innsbruck* 76, S. 169.

39. Gallucci, M.; Cerone, G.; Caulo, M.; Splendiani, A.; Amicis, R. de; Masciocchi, C. (2006): MRI in head injuries. In: *Emergency Neuroradiology*: Springer, S. 163–178.
40. Barrett, Tristan; Brechbiel, Martin; Bernardo, Marcelino; Choyke, Peter L. (2007): MRI of tumor angiogenesis. In: *Journal of magnetic resonance imaging* 26 (2), S. 235–249.
41. Brasch, Robert; Turetschek, Karl (2000): MRI characterization of tumors and grading angiogenesis using macromolecular contrast media. Status report. In: *European journal of radiology* 34 (3), S. 148–155.
42. Kraus, M.; Mauch, F.; Ammann, B.; Cunningham, M.; Gebhard, F. (2014): Anwendungsgebiete der Magnetresonanztomographie in der Traumatologie. In: *Der Unfallchirurg* 117 (3), S. 190–196.
43. Hoskins, Peter R.; Martin, Kevin; Thrush, Abigail (2010): Diagnostic ultrasound. Physics and equipment: Cambridge University Press.
44. Avent, Neil D.; Chitty, Lyn S. (2006): Non- invasive diagnosis of fetal sex; utilisation of free fetal DNA in maternal plasma and ultrasound. In: *Prenatal diagnosis* 26 (7), S. 598–603.
45. Lederle, Frank A.; Walker, Janine M.; Reinke, Donovan B. (1988): Selective screening for abdominal aortic aneurysms with physical examination and ultrasound. In: *Archives of internal medicine* 148 (8), S. 1753–1756.
46. Kuhn, Marie; Bonnin, Robert L. L.; Davey, Michael J.; Rowland, Jane L.; Le Langlois, Suzanne P. (2000): Emergency department ultrasound scanning for abdominal aortic aneurysm. Accessible, accurate, and advantageous. In: *Annals of emergency medicine* 36 (3), S. 219–223.
47. Pilla, A. A.; Mont, M. A.; Nasser, P. R.; Khan, S. A.; Figueiredo, M.; Kaufman, J. J.; Siffert, R. S. (1989): Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. In: *Journal of orthopaedic trauma* 4 (3), S. 246–253.
48. Heckman, James D.; McCabe, Joan; Rni, John J. (1994): By non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. In: *J Bone Joint Surg Am* 76, S. 26–34.

49. Kamin, Gabriele (2008): Die Entwicklung der Ultraschalltechnik für die Diagnostik in der Geburtshilfe.
50. Mülhaupt, Rolf (2004): Hermann Staudinger and the origin of macromolecular chemistry. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 43 (9), S. 1054–1063. DOI: 10.1002/anie.200330070.
51. Wallenfels, Kurt; Streffer, Christian (1964): Chemische Reaktivität von Proteinen. In: *Mechanismen Enzymatischer Reaktionen*: Springer, S. 6–46.
52. Richard, Daniel; Chevalet, Patrick; Pradere, Fabienne; Giraud, Nathalie; Soubaya, Thierry (2013): Aufgaben der organischen Biomoleküle. In: *Biologie im Überblick*: Springer, S. 13–18.
53. Ferry, John D. (1980): *Viscoelastic properties of polymers*: John Wiley & Sons.
54. Koltzenburg, Sebastian; Maskos, Michael; Nuyken, Oskar; Mülhaupt, Rolf (2014): *Polymere. Synthese, Eigenschaften und Anwendungen*. Berlin: Springer Spektrum. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-34773-3>.
55. Wegner, Gerhard (1981): Polymere mit metallähnlicher Leitfähigkeit–Ein Überblick über Synthese, Struktur und Eigenschaften. In: *Angewandte Chemie* 93 (4), S. 352–371.
56. Eyerer, Peter; Hirth, Thomas; Elsner, Peter (2008): *Polymer Engineering*: Springer Science & Business Media.
57. Küchler, Leopold (2013): *Polymerisationskinetik*: Springer-Verlag.
58. Nair, Lakshmi S.; Laurencin, Cato T. (2007): Biodegradable polymers as biomaterials. In: *Progress in polymer science* 32 (8), S. 762–798.
59. Rinkenauer, Alexandra C.; Schubert, Stephanie; Traeger, Anja; Schubert, Ulrich S. (2015): The influence of polymer architecture on in vitro pDNA transfection. In: *Journal of Materials Chemistry B* 3 (38), S. 7477–7493.
60. Agrawal, C. M.; Haas, K. F.; Leopold, D. A.; Clark, H. G. (1992): Evaluation of poly (L-lactic acid) as a material for intravascular polymeric stents. In: *Biomaterials* 13 (3), S. 176–182.

61. Lendlein, Andreas; Behl, Marc; Hiebl, Bernhard; Wischke, Christian (2010): Shape-memory polymers as a technology platform for biomedical applications. In: *Expert Review of Medical Devices* 7 (3), S. 357–379.
62. Törmälä, P. (1992): Biodegradable self-reinforced composite materials; manufacturing structure and mechanical properties. In: *Clinical materials* 10 (1-2), S. 29–34.
63. Bromberg, Lev E.; Ron, Eyal S. (1998): Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery. In: *Advanced drug delivery reviews* 31 (3), S. 197–221.
64. Schmaljohann, Dirk (2006): Thermo-and pH-responsive polymers in drug delivery. In: *Advanced drug delivery reviews* 58 (15), S. 1655–1670.
65. Chilkoti, Ashutosh; Dreher, Matthew R.; Meyer, Dan E.; Raucher, Drazen (2002): Targeted drug delivery by thermally responsive polymers. In: *Advanced drug delivery reviews* 54 (5), S. 613–630.
66. Pinnapireddy, SR; Duse, L.; Akbari, D.; Bakowsky, U. (2017): Photo-Enhanced Delivery of Genetic Material Using Curcumin Loaded Composite Nanocarriers. In: *Clin Oncol* 2, S. 1323.
67. Duse, Lili; Pinnapireddy, Shashank Reddy; Strehlow, Boris; Jedelská, Jarmila; Bakowsky, Udo (2017): Low level LED photodynamic therapy using curcumin loaded tetraether liposomes. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.
68. Mahmoud, Gihan; Jedelská, Jarmila; Strehlow, Boris; Bakowsky, Udo (2015): Bipolar tetraether lipids derived from thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* for membrane stabilization of chlorin e6 based liposomes for photodynamic therapy. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 95, S. 88–98.
69. Huo, Meng; Yuan, Jinying; Tao, Lei; Wei, Yen (2014): Redox-responsive polymers for drug delivery. From molecular design to applications. In: *Polymer Chemistry* 5 (5), S. 1519–1528.

70. Yan, Qiang; Yuan, Jinying; Cai, Zhinan; Xin, Yan; Kang, Yan; Yin, Yingwu (2010): Voltage-responsive vesicles based on orthogonal assembly of two homopolymers. In: *Journal of the American Chemical Society* 132 (27), S. 9268–9270.
71. Mura, Simona; Nicolas, Julien; Couvreur, Patrick (2013): Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. In: *Nature materials* 12 (11), S. 991–1003.
72. Hrubý, Martin; Koňák, Čestmír; Ulbrich, Karel (2005): Polymeric micellar pH-sensitive drug delivery system for doxorubicin. In: *Journal of Controlled Release* 103 (1), S. 137–148.
73. Gupta, Piyush; Vermani, Kavita; Garg, Sanjay (2002): Hydrogels. From controlled release to pH-responsive drug delivery. In: *Drug discovery today* 7 (10), S. 569–579.
74. Yoshida, Takayuki; Lai, Tsz Chung; Kwon, Glen S.; Sako, Kazuhiro (2013): pH-and ion-sensitive polymers for drug delivery. In: *Expert opinion on drug delivery* 10 (11), S. 1497–1513.
75. Matsumoto, Akira; Yoshida, Ryo; Kataoka, Kazunori (2004): Glucose-responsive polymer gel bearing phenylborate derivative as a glucose-sensing moiety operating at the physiological pH. In: *Biomacromolecules* 5 (3), S. 1038–1045.
76. Miyata, Takashi; Asami, Noriko; Uragami, Tadashi (1999): A reversibly antigen-responsive hydrogel. In: *Nature* 399 (6738), S. 766–769.
77. Miyata, Takashi; Asami, Noriko; Uragami, Tadashi (2009): Structural design of stimuli-responsive bioconjugated hydrogels that respond to a target antigen. In: *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 47 (21), S. 2144–2157.
78. Kim, Gi-Wook; Kang, Changsun; Oh, Young-Bin; Ko, Myoung-Hwan; Seo, Jeong-Hwan; Lee, Dongwon (2017): Ultrasonographic Imaging and Anti-inflammatory Therapy of Muscle and Tendon Injuries Using Polymer Nanoparticles. In: *Theranostics* 7 (9), S. 2463–2476. DOI: 10.7150/thno.18922.
79. Sun, Ying; Wang, Qi; Chen, Jianhua; Liu, Lei; Ding, Li; Shen, Ming et al. (2017): Temperature-Sensitive Gold Nanoparticle-Coated Pluronic-PLL Nanoparticles for Drug

- Delivery and Chemo-Photothermal Therapy. In: *Theranostics* 7 (18), S. 4424–4444. DOI: 10.7150/thno.18832.
80. Vasile, Cornelia (2000): Handbook of polyolefins: CRC Press.
81. Maitz, M. F. (2015): Applications of synthetic polymers in clinical medicine. In: *Biosurface and Biotribology* 1 (3), S. 161–176.
82. Barte, Barry Kyle; Carr, J. A. (1995): Evaluation of a high-density polytetrafluoroethylene (n-PTFE) membrane as a barrier material to facilitate guided bone regeneration in the rat mandible. In: *J Oral Implantol* 21 (2), S. 88–95.
83. Hansbrough, John F.; Morgan, Judy; Greenleaf, Glenn; Underwood, Johnnie (1994): Development of a temporary living skin replacement composed of human neonatal fibroblasts cultured in Biobrane, a synthetic dressing material. In: *Surgery* 115 (5), S. 633–644.
84. Folarin, O. M.; Sadiku, E. R. (2011): Thermal stabilizers for poly (vinyl chloride). A review. In: *International Journal of Physical Sciences* 6 (18), S. 4323–4330.
85. Hmel, Peter J.; Kennedy, Anthony; Quiles, John G.; Gorogias, Martha; Seelbaugh, Joseph P.; Morrisette, Craig R. et al. (2002): Physical and thermal properties of blood storage bags. Implications for shipping frozen components on dry ice. In: *Transfusion* 42 (7), S. 836–846.
86. Smith, M. D.; Grant, M. H.; Blass, C. R.; Courtney, J. M.; Barbenel, J. C. (1996): Poly (vinyl chloride) formulations. Acute toxicity to cultured human cell lines. In: *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 7 (5), S. 453–459.
87. Jaques, L. B.; Fidler, E.; Feldsted, E. T.; MacDonald, A. G. (1946): Silicones and blood coagulation. In: *Canadian Medical Association Journal* 55 (1), S. 26.
88. Kim, Jinah; Conway, Anthony; Chauhan, Anuj (2008): Extended delivery of ophthalmic drugs by silicone hydrogel contact lenses. In: *Biomaterials* 29 (14), S. 2259–2269.
89. Swanson, Alfred B. (1968): Silicone rubber implants for replacement of arthritic or destroyed joints in the hand. In: *Surgical Clinics of North America* 48 (5), S. 1113–1127.

90. Frazer, Robert Q.; Byron, Raymond T.; Osborne, Paul B.; West, Karen P. (2005): PMMA. An essential material in medicine and dentistry. In: *Journal of long-term effects of medical implants* 15 (6).
91. Tsukeoka, Tadashi; Suzuki, Masahiko; Ohtsuki, Chikara; Sugino, Atsushi; Tsuneizumi, Yoshikazu; Miyagi, Jin et al. (2006): Mechanical and histological evaluation of a PMMA-based bone cement modified with γ -methacryloxypropyltrimethoxysilane and calcium acetate. In: *Biomaterials* 27 (21), S. 3897–3903.
92. Puckett, Aaron D.; Roberts, Brad; Bu, Lujia; Mays, Jimmy W. (2000): Improved orthopaedic bone cement formulations based on rubber toughening. In: *Critical ReviewsTM in Biomedical Engineering* 28 (3&4).
93. Ferruti, Paolo; Grigolini, Michela; Ranucci, Elisabetta (2004): PHEMA Hydrogels Obtained by a Novel Low- Heat Curing Procedure with a Potential for In Situ Preparation. In: *Macromolecular bioscience* 4 (6), S. 591–600.
94. Hariharan, S.; Bhardwaj, V.; Bala, I.; Sitterberg, J.; Bakowsky, U.; Kumar, M. RaviN.V. (2006): Design of estradiol loaded PLGA nanoparticulate formulations. A potential oral delivery system for hormone therapy. In: *Pharmaceutical research* 23 (1), S. 184–195.
95. Kumar, M. RaviN.V.; Bakowsky, U.; Lehr, C. M. (2004): Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. In: *Biomaterials* 25 (10), S. 1771–1777.
96. Wang, Mian; Bhardwaj, Garima; Webster, Thomas J. (2017): Antibacterial properties of PEKK for orthopedic applications. In: *International Journal of Nanomedicine* 12, S. 6471.
97. Zoidis, Panagiotis; Papathanasiou, Ioannis; Polyzois, Gregory (2016): The Use of a Modified Poly- Ether- Ether- Ketone (PEEK) as an Alternative Framework Material for Removable Dental Prostheses. A Clinical Report. In: *Journal of Prosthodontics* 25 (7), S. 580–584.
98. Self, Milton M.; Cooley, Denton A.; DeBakey, Michael E.; Creech Jr, Oscar (1955): The use of braided nylon tubes for aortic replacement. In: *Annals of surgery* 142 (5), S. 836.

99. Tsantrizos, Anthony; Ordway, Nathaniel R.; Myint, Khin; Martz, Erik; Yuan, Hansen A. (2008): Mechanical and biomechanical characterization of a polyurethane nucleus replacement device injected and cured in situ within a balloon. In: *SAS journal* 2 (1), S. 28–39.
100. Zieren, Jürgen; Paul, Marco; Osei-Agyemang, Thomas; Maecker, Folkert; Müller, Jochen M. (2002): Polyurethane-covered dacron mesh versus polytetrafluoroethylene DualMesh for intraperitoneal hernia repair in rats. In: *Surgery today* 32 (10), S. 884–886.
101. Freziers, Ron G.; Walsh, Terri L.; Nelson, Anita L.; Clark, Virginia A.; Coulson, Anne H. (1998): Breakage and acceptability of a polyurethane condom. A randomized, controlled study. In: *Family planning perspectives*, S. 73–78.
102. Marois, Yves; Akoum, Ali; King, Martin; Guidoin, Robert; Maltzahn, Wolf Von; Kowligi, Rajagopal et al. (1993): A novel microporous polyurethane vascular graft. In vivo evaluation of the UTA prosthesis implanted as infra-renal aortic substitute in dogs. In: *Journal of Investigative Surgery* 6 (3), S. 273–288.
103. Inoue, Hiroyuki; Fujimoto, Keiji; Uyama, Yoshikimi; Ikada, Yoshito (1997): Ex vivo and in vivo evaluation of the blood compatibility of surface- modified polyurethane catheters. In: *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 35 (2), S. 255–264.
104. Comyn, John (2007): Adhesion science: Royal Society of Chemistry.
105. Behan, Niall; Birkinshaw, Colin; Clarke, Nuala (2001): Poly n-butyl cyanoacrylate nanoparticles. A mechanistic study of polymerisation and particle formation. In: *Biomaterials* 22 (11), S. 1335–1344.
106. Luo, Dong Qing; Guo, Jian Hua; Wang, Feng Jie; Jin, Zhi Xiong; Cheng, Xiao Li; Zhu, Jian Cheng et al. (2009): Anti-fungal efficacy of polybutylcyanoacrylate nanoparticles of allicin and comparison with pure allicin. In: *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 20 (1), S. 21–31.
107. Xi-xiao, Yang; Jan-hai, Chen; Shi-ting, Liu; Dan, Guo; Xv-xin, Zeng (2006): Polybutylcyanoacrylate nanoparticles as a carrier for mitomycin C in rabbits bearing VX2-liver tumor. In: *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 46 (3), S. 211–217.

108. Ambruosi, Alessandra; Khalansky, Alexander S.; Yamamoto, Hiromitsu; Gelperina, Svetlana E.; Begley, David J.; Kreuter, Jörg (2006): Biodistribution of polysorbate 80-coated doxorubicin-loaded [14C]-poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles after intravenous administration to glioblastoma-bearing rats. In: *Journal of drug targeting* 14 (2), S. 97–105.
109. Musyanovych, Anna; Landfester, Katharina (2008): Synthesis of poly (butylcyanoacrylate) nanocapsules by interfacial polymerization in miniemulsions for the delivery of DNA molecules. In: *Surface and Interfacial Forces–From Fundamentals to Applications*, S. 120–127.
110. Joshi, Shrinidh A.; Chavhan, Sandip S.; Sawant, Krutika K. (2010): Rivastigmine-loaded PLGA and PBCA nanoparticles. Preparation, optimization, characterization, in vitro and pharmacodynamic studies. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 76 (2), S. 189–199.
111. Shahmabadi, Hasan Ebrahimi; Movahedi, Fatemeh; Esfahani, Maedeh Koohi Moftakhari; Alavi, Seyed Ebrahim; Eslamifar, Ali; Anaraki, Gholamreza Mohammadi; Akbarzadeh, Azim (2014): Efficacy of Cisplatin-loaded polybutyl cyanoacrylate nanoparticles on the glioblastoma. In: *Tumor Biology* 35 (5), S. 4799–4806.
112. Huang, Chi-Yu; Chen, Chih-Ming; Lee, Yu-Der (2007): Synthesis of high loading and encapsulation efficient paclitaxel-loaded poly (n-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion. In: *International journal of pharmaceutics* 338 (1), S. 267–275.
113. Wischke, Christian; Weigel, Judith; Lendlein, Andreas (2015): Poly (n-butylcyanoacrylate) Nanoparticles as Carriers for Adenosine triphosphate. In: *MRS Online Proceedings Library Archive* 1718, S. 131–136.
114. Spivak, Igor; Rix, Anne; Schmitz, Georg; Fokong, Stanley; Iranzo, Olga; Lederle, Wiltrud; Kiessling, Fabian (2016): Low-dose molecular ultrasound imaging with E-selectin-targeted PBCA microbubbles. In: *Molecular Imaging and Biology* 18 (2), S. 180–190.
115. Schmitz, Georg (2008): Ultrasonic imaging of molecular targets. In: *Basic research in cardiology* 103 (2), S. 174–181.

116. Shubhra, Quazi T. H.; Tóth, Judit; Gyenis, János; Feczko, Tivadar (2014): Poloxamers for surface modification of hydrophobic drug carriers and their effects on drug delivery. In: *Polymer Reviews* 54 (1), S. 112–138.
117. Palmowski, Moritz; Morgenstern, Bernd; Hauff, Peter; Reinhardt, Michael; Huppert, Jochen; Maurer, Mathias et al. (2008): Pharmacodynamics of streptavidin-coated cyanoacrylate microbubbles designed for molecular ultrasound imaging. In: *Investigative radiology* 43 (3), S. 162–169.
118. Kuo, Yung-Chih; Chung, Chiu-Yen (2012): Transcytosis of CRM197-grafted polybutylcyanoacrylate nanoparticles for delivering zidovudine across human brain-microvascular endothelial cells. In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 91, S. 242–249.
119. Fokong, Stanley; Fragoso, Ana; Rix, Anne; Curaj, Adelina; Wu, Zhuojun; Lederle, Wiltrud et al. (2013): Ultrasound molecular imaging of E-selectin in tumor vessels using poly n-butyl cyanoacrylate microbubbles covalently coupled to a short targeting peptide. In: *Investigative radiology* 48 (12), S. 843–850.
120. Theek, Benjamin; Gremse, Felix; Kunjachan, Sijumon; Fokong, Stanley; Pola, Robert; Pechar, Michal et al. (2014): Characterizing EPR-mediated passive drug targeting using contrast-enhanced functional ultrasound imaging. In: *Journal of Controlled Release* 182, S. 83–89.
121. Newman, Paul G.; Rozycki, Grace S. (1998): The history of ultrasound. In: *Surgical Clinics of North America* 78 (2), S. 179–195.
122. Becht, Stefanie; Bittner, Roland C.; Ohmstede, Anke; Pfeiffer, Andreas; Roßdeutscher, Reinhard (2008): Lehrbuch der röntgendiagnostischen Einstelltechnik. Begründet von M. Zimmer-Brossy. Sechste, neubearbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-31709-8>.
123. Flachskampf, Frank A. (2006): Kursbuch Echokardiographie. Unter Berücksichtigung der Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie und der KBV ; 42 Tabellen ; [mit CD-ROM]. 3., durchges. Aufl. Stuttgart: Thieme.

124. Koley, Dipankar; Bard, Allen J. (2010): Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (39), S. 16783–16787.
125. Rao, A., Schoenenberger, M., Gnecco, E., Glatzel, T., Meyer, E., Brändlin, D., & Scandella, L. (Hg.) (2007): Characterization of nanoparticles using atomic force microscopy. *Journal of Physics: Conference Series*: IOP Publishing (1).
126. Grobelny, Jaroslaw; DelRio, Frank W.; Pradeep, Namboodiri; Kim, Doo-In; Hackley, Vincent A.; Cook, Robert F. (2011): Size measurement of nanoparticles using atomic force microscopy. In: *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*, S. 71–82.
127. Palmowski, Moritz; Huppert, Jochen; Ladewig, Gesa; Hauff, Peter; Reinhardt, Michael; Mueller, Margareta M. et al. (2008): Molecular profiling of angiogenesis with targeted ultrasound imaging. Early assessment of antiangiogenic therapy effects. In: *Molecular cancer therapeutics* 7 (1), S. 101–109.
128. Olbrich, Carsten; Hauff, Peter; Scholle, Frank; Schmidt, Wolfgang; Bakowsky, Udo; Briel, Andreas; Schirner, Michael (2006): The in vitro stability of air-filled polybutylcyanoacrylate microparticles. In: *Biomaterials* 27 (19), S. 3549–3559.
129. Jin, Q. F.; Zhong, Y.; Luo, X. L. (2008): Aolymer-encapsulated microbubble contrast agent. Preparation and in vitro echogenic characteristics. In: *Nan fang yi ke da xue bao= Journal of Southern Medical University* 28 (1), S. 54–56.
130. Sennoga, Charles A.; Yeh, James S. M.; Alter, Julia; Stride, Eleanor; Nihoyannopoulos, Petros; Seddon, John M. et al. (2012): Evaluation of methods for sizing and counting of ultrasound contrast agents. In: *Ultrasound in medicine & biology* 38 (5), S. 834–845.
131. Cavalieri, Francesca; Best, James P.; Perez, Camilo; Tu, Juan; Caruso, Frank; Matula, Thomas J.; Ashokkumar, Muthupandian (2013): Mechanical characterization of ultrasonically synthesized microbubble shells by flow cytometry and AFM. In: *ACS applied materials & interfaces* 5 (21), S. 10920–10925.

132. Cosgrove, David (2006): Ultrasound contrast agents. An overview. In: *European journal of radiology* 60 (3), S. 324–330.
133. Brüßler, Jana; Marxer, Elena; Becker, Andreas; Schubert, Rolf; Schümmelfeder, Joachim; Nimsky, Christopher; Bakowsky, Udo (2014): Correlation of structure and echogenicity of nanoscaled ultrasound contrast agents in vitro. In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 117, S. 206–215.
134. Opatrný Jr, Karel (2003): Clinical importance of biocompatibility and its effect on haemodialysis treatment. In: *Nephrology Dialysis Transplantation* 18 (suppl_5), v41-v44.
135. Kohane, Daniel S.; Langer, Robert (2010): Biocompatibility and drug delivery systems. In: *Chemical Science* 1 (4), S. 441–446.
136. van Meerloo, Johan; Kaspers, Gertjan J. L.; Cloos, Jacqueline (2011): Cell sensitivity assays. The MTT assay. In: *Cancer cell culture: methods and protocols*, S. 237–245.
137. Valdes, T. I.; Kreutzer, D.; Moussy, F. (2002): The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. In: *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 62 (2), S. 273–282.
138. Baiguera, Silvia; Macchiarini, Paolo; Ribatti, Domenico (2012): Chorioallantoic membrane for in vivo investigation of tissue- engineered construct biocompatibility. In: *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 100 (5), S. 1425–1434.
139. Wilson, Barnabas; Samanta, Malay Kumar; Santhi, Kumaraswamy; Kumar, Kokilampal Perumal Sampath; Paramakrishnan, Nallupillai; Suresh, Bhojraj (2008): Poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease. In: *Brain Research* 1200, S. 159–168.
140. Simeonova, M.; Antcheva, M.; Chorbadjiev, K. (2003): Study on the effect of polybutyl-2-cyanoacrylate nanoparticles and their metabolites on the phagocytic activity of peritoneal exudate cells of mice. In: *Biomaterials* 24 (2), S. 313–320.

141. Lin, Ching-Erh (2004): Determination of critical micelle concentration of surfactants by capillary electrophoresis. In: *Journal of Chromatography A* 1037 (1), S. 467–478.
142. Brar, Satinder K.; Verma, M. (2011): Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. In: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 30 (1), S. 4–17.
143. Ash, Michael; Ash, Irene (2010): *Handbook of industrial surfactants*. 5th ed. Endicott, N.Y.: Synapse Information Resources.
144. Zoeller, Nancy; Blankschtein, Daniel (1998): Experimental determination of micelle shape and size in aqueous solutions of dodecyl ethoxy sulfates. In: *Langmuir* 14 (25), S. 7155–7165.
145. Fokong, Stanley; Siepmann, Monica; Liu, Zhe; Schmitz, Georg; Kiessling, Fabian; Gätjens, Jessica (2011): Advanced characterization and refinement of poly N-butyl cyanoacrylate microbubbles for ultrasound imaging. In: *Ultrasound in medicine & biology* 37 (10), S. 1622–1634.
146. Paefgen, Vera; Doleschel, Dennis; Kiessling, Fabian (2015): Evolution of contrast agents for ultrasound imaging and ultrasound-mediated drug delivery. In: *Frontiers in pharmacology* 6.
147. Koczera, Patrick; Appold, Lia; Shi, Yang; Liu, Mengjiao; Dasgupta, Anshuman; Pathak, Vertika et al. (2017): PBCA-based polymeric microbubbles for molecular imaging and drug delivery. In: *Journal of Controlled Release*.
148. Uchida, Tsutomu; Liu, Shu; Enari, Masatoshi; Oshita, Seiichi; Yamazaki, Kenji; Gohara, Kazutoshi (2016): Effect of NaCl on the Lifetime of Micro-and Nanobubbles. In: *Nanomaterials* 6 (2), S. 31.
149. Garcia, Ricardo; Perez, Ruben (2002): Dynamic atomic force microscopy methods. In: *Surface science reports* 47 (6), S. 197–301.
150. Winiarski, B.; Schajer, G. S.; Withers, P. J. (2012): Surface decoration for improving the accuracy of displacement measurements by digital image correlation in SEM. In: *Experimental mechanics* 52 (7), S. 793–804.

151. Gibbons, Barbara H.; Gibbons, I. R. (1972): Flagellar movement and adenosine triphosphatase activity in sea urchin sperm extracted with Triton X-100. In: *The Journal of Cell Biology* 54 (1), S. 75–97.
152. Gorce, Jean-Marie; Arditi, Marcel; Schneider, Michel (2000): Influence of bubble size distribution on the echogenicity of ultrasound contrast agents. A study of SonoVue™. In: *Investigative radiology* 35 (11), S. 661–671.
153. Vargas, Angelica; Zeisser-Labouèbe, Magali; Lange, Norbert; Gurny, Robert; Delie, Florence (2007): The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. In: *Advanced drug delivery reviews* 59 (11), S. 1162–1176.
154. Alheshibri, Muidh; Qian, Jing; Jehannin, Marie; Craig, Vincent S. J. (2016): A history of nanobubbles. In: *Langmuir* 32 (43), S. 11086–11100.
155. Soppimath, Kumaresh S.; Aminabhavi, Tejraj M.; Kulkarni, Anandrao R.; Rudzinski, Walter E. (2001): Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. In: *Journal of Controlled Release* 70 (1), S. 1–20.
156. Yao, Hui; Wang, Kaiyuan; Wang, Yi; Wang, Shanshan; Li, Jianfeng; Lou, Jinning et al. (2015): Enhanced blood–brain barrier penetration and glioma therapy mediated by a new peptide modified gene delivery system. In: *Biomaterials* 37, S. 345–352.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

a	Beschleunigung
AFM	atomic force microscopy
c	Geschwindigkeit
CAM	Chorioallantois-Membran-Modell
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration
CT	Computertomographie
D	Diffusionskoeffizient
DLS	dynamische Lichtstreuung
d_{\min}	Auflösungsgrenze
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	elektrische Feldstärke
EDD	egg development day
f	Frequenz
$f_{(ka)}$	Henry Funktion
FDG	Fluorodesoxyglukose
HeNe	Helium-Neon
k_B	Boltzmann-Konstante
MB	Mikrobubbles
MRT	Magnetresonanztomographie
NB	Nanobubbles
PBCA	Polybutylcyanoacrylat
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDI	Polydispersitätsindex
PDLA	Poly-L-Milchsäure
PDMS	Polydimethylsilane
PDO	Polydioxane
PE	Polyethylene
PEEK	Polyetheretherketon

PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PGA	Polyglykolsäure
pHEMA	Poly(ethyl)hydroxymethacrylat
PLGA	Polylactidcoglykolid
PLLA	Poly-L-Milchsäure
PMMA	Polymethylmethacrylat
PP	Polypropylene
PTFE	Polytetrafluoroethylene
PVC	Polyvinylchlorid
R	Reflektionskoeffizient
r	Radius
R_0	hydrodynamischer Radius
REM	Rasterelektronenmikroskop
T	Temperatur
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
U_e	elektrophoretische Beweglichkeit
v_p	Sedimentationsgeschwindigkeit des Partikels
z	Impedanz
ϵ	Dielektrizitätskonstante
ζ	Zetapotential
η	Viskosität
λ	Wellenlänge
ρ	Dichte
ρ_f	Dichte des Dispersionsmediums
ρ_p	Dichte eines Partikels

8.2 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1.1: ALTES RÖNTGENGERÄT (CLYDE SNOOK'S VICTOR ELECTRIC Co.), MECHANISCH AUFZUFÜLLEN VON 1904 [3].	7
ABBILDUNG 1.2: RADIOLOGISCHER ODER FLUOROSKOPISCHER UNTERSUCHUNGSaufbau IN DEN DREIßIGER JAHREN [3].	8
ABBILDUNG 1.3: VEREINFACHTER aufbau EINES POLYMERS AUS N MONOMEREN.	12
ABBILDUNG 1.4: SCHEMA VON STUFENREAKTIONEN BEI POLYESTERN, POLYAMIDEN UND POLYURTHANEN (OBEN) UND KETTENWACHSTUMSREAKTION (UNTEN) [56].	13
ABBILDUNG 1.5: ÜBERSICHT ÜBER POLYMERISATIONSMÖGLICHKEITEN UND DEREN ARCHITEKTUREN [57].	14
ABBILDUNG 1.6: CHEMISCHE STRUKTUR DER POLYOLEFINE [80].	15
ABBILDUNG 1.7: CHEMISCHE STRUKTUR VON TEFLON® [80].	15
ABBILDUNG 1.8: CHEMISCHE STRUKTUR VON POLYVINYLCHLORID [80].	16
ABBILDUNG 1.9: CHEMISCHE STRUKTUR DER SILIKONE [80].	17
ABBILDUNG 1.10: CHEMISCHE STRUKTUR DER POLYACRYLATE [80].	18
ABBILDUNG 1.11: CHEMISCHE STRUKTUR DER POLYESTER [80].	19
ABBILDUNG 1.12: CHEMISCHE STRUKTUR DER POLYETHER [80].	19
ABBILDUNG 1.13: CHEMISCHE STRUKTUR DER POLYAMIDE [80].	20
ABBILDUNG 1.14: CHEMISCHE STRUKTUR DER POLYURETHANE [80].	21
ABBILDUNG 1.15: CHEMISCHE STRUKTUR VON PBCA. R1=butyl.	21
ABBILDUNG 3.1: CHEMISCHE FORMEL VON TRITON X-100, WELCHES ALS TENSID VERWENDET WIRD.	31
ABBILDUNG 3.2: CHEMISCHE FORMEL VON TWEEN 80, WELCHES EBENFALLS ALS TENSID VERWENDET WIRD.	32
ABBILDUNG 3.3: SCHEMATISCHER aufbau DES REAKTORS ZUR NANOPARTIKELHERSTELLUNG. A: RÜHRWERKZEUG MIT REGELBARER GESCHWINDIGKEIT (LINKS LAMELLEN, RECHTS PROPELLER); B: REAKTOR; C: EINLASSTOPFEN FÜR PBCA; D: SAURE TENSIDLÖSUNG, E: KÜHLAGGREGAT MIT KÜHLKREISLAUF.	33
ABBILDUNG 3.4: REAKTIONSGLEICHUNG DER ANIONISCHEN POLYMERISATION VON N-BUTYLCYANOARYLAT.	33
ABBILDUNG 3.5: PRINZIP DER DYNAMISCHEN LICHTSTREUUNG ANHAND GROßER (OBERE ABBILDUNG) UND KLEINER (UNTERE ABBILDUNG) PARTIKEL. A: LASER MIT WELLENLÄNGE VON 633NM; B: KÜVETTE (DTS 1060); C: GROßER ODER KLEINER PARTIKEL; D: INTENSITÄTSÄNDERUNG DES LASERSTRAHLS NACH AUFTREFFEN AUF GROßE ODER KLEINE PARTIKEL GEGENÜBER DER ZEIT.	35
ABBILDUNG 3.6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER AFM MESSUNG. A: MESSTISCH IN XY-RICHTUNG VERSTELLBAR; B: ZU UNTERSUCHENDE PROBE; C: CANTILEVER; D: LASER; E: PHOTODETEKTOR.	38
ABBILDUNG 3.7: MESSPRINZIP DER ANALYTISCHEN ZENTRIFUGE. A: HOMOGEN VERTEILTE PROBE MIT GLEICHMÄßIGER TRANSMISSION; B: AUFLÄRUNG DER PROBE IM OBEREN TEIL DER KÜVETTE, ANFÄNGLICHE SEDIMENTBILDUNG IM UNTEREN TEIL DER KÜVETTE; C: WEITERES AUFLÄREN DER PROBE UND VERGRÖßERUNG DES SEDIMENTS; D: VOLLSTÄNDIG SEDIMENTIERTE PROBE.	39
ABBILDUNG 3.8: VERSUCHSAufbau ZUR NANOBUBBLEHERSTELLUNG. DAS EISBAD DIENT ZUR KÜHLUNG DER NANOSUSPENSION. DIE SUSPENSION WURDE MIT DER HÖHENVERSTELLUNG NACH OBEN GEFÄHRT, BIS DIE ULTRASCHALLSTABSPITZE IN DIE SUSPENSION HINEINRAGTE.	42
ABBILDUNG 3.9: SCHEMATISCHER aufbau EINES RASTERELEKTRONENMIKROSKOPS. DER PRIMÄRELEKTRONENSTRAHL, WELCHER VON DER KATHODE AUSGESTRAHLT WIRD, TRIFFT AUF DIE PROBE UND SENDET EINEN SEKUNDÄRELEKTRONENSTRAHL RICHTUNG DETEKTOR. DABEI RASTERT DER ELEKTRONENSTRAHL DIE PROBE IN EINEM VORGEgebenEN MUSTER AB. DAS SIGNAL WIRD VERSTÄRKT UND AUF DEN BILDSCHIRM PROJIZIERT.	44
ABBILDUNG 3.10: SCHEMATISCHER aufbau EINES TRANSMISSIONELEKTRONENMIKROSKOPS. DER ELEKTRONENSTRAHL, WELCHER VON DER KATHODE GENERIERT WIRD, DURCHQUERT DIE VAKUUMKAMMER. ER PASSIERT KONDENSATORSPULEN UND –BLENDE UND TRIFFT AUF DAS ZU UNTERSUCHENDE OBJEKT, WELCHES DURCH DIE SCHLEUSE EINGEFÜHRT WERDEN KANN. DER STRAHL DURCHSTRAHLT ANDERS, ALS BEIM	

RASTERELEKTRONENMIKROSKOP, DIE PROBE. ÜBER EINE WEITERE BLENDE, DIE OBJEKTSPULE, DIE PROJEKTIONSSPULE UND DEN LEUCHTSCHIRM TRIFFT DER ELEKTRONENSTRAHL AUF DEN DETEKTOR. DAS ENTSTANDENE BILD KANN ÜBER EIN MIKROSKOP BETRACHTET WERDEN.	47
ABBILDUNG 3.11: SCHEMATISCHER AUFBAU DER KONTRASTVERSTÄRKUNGSMESSUNG. A: BECHERGLAS MIT PROBE; B: SCHLAUCHSYSTEM; C: PERISTALTIKPUMPE; D: AGAR-GELBLOCK; E: SCHALLSONDE; F: MANOMETER.	50
ABBILDUNG 3.12: FARBREAKTION DES MTT-REAGENZES ZU EINEM SCHWER LÖSLICHEN SALZ, DEM FORMAZAN. DAS FORMAZAN KANN NACH GEWINNUNG PHOTOMETRISCH ANALYSIERT WERDEN, UM SO EINEN RÜCKSCHLUSS AUF DIE ÜBERLEBENSRADE DER ZELLEN ZU BEKOMMEN, DA DIE REAKTION VON DEN REDUKTIONSÄQUIVALENTEN NADH UND NADPH ABHÄNGT.	52
ABBILDUNG 4.1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER AUFREINIGUNG DER NANOPARTIKEL (ROTE PUNKTE). A: VOR DER ZENTRIFUGATION SIND DIE NANOPARTIKEL IN LÖSUNG VON GROßEN POLYMERKETTEN UND AGGLOMERATEN (BLAUE LÖSUNG) UMGEBEN; B: DURCH DIE ZENTRIFUGATION KONNTEN DIE GROßEN POLYMERKETTEN VON DEN NANOPARTIKELN GETRENNT WERDEN UND SIND ALS BODENSATZ IM ZENTRIFUGIERGEFÄß ERKENNBAR. JETZT SOLLTEN NUR NOCH NANO- UND MIKROPARTIKEL IN LÖSUNG SEIN; C: DIE ANSCHLIEßENDE FILTRATION REINIGT DIE PARTIKEL WEITER AUF. DIE ÜBRIGEN PARTIKEL HABEN EINEN DURCHMESSER VON $\leq 0,22\mu\text{m}$	53
ABBILDUNG 4.2: GEMESSENER HYDRODYNAMISCHER DURCHMESSER DER TWEEN 80 NANOPARTIKEL FORMULIERUNGEN NACH BESTIMMTER LAGERDAUER. DEN GERINGSTEN GRÖßENZUWACHS VERZEICHNETEN DIE 1%IGE UND DIE 2%IGE FORMULIERUNGEN. DIE 4%IGE TWEEN 80 FORMULIERUNG ERFUHR DIE GRÖßTE ZUNAHME ÜBER 14 TAGE, SODASS DIE PARTIKEL IM MITTEL $10,89\text{nm} \pm 1,65\text{nm}$ GROß WAREN.	56
ABBILDUNG 4.3: GEMESSENER POLYDISPERSITÄTSINDEX (PDI) DER TWEEN 80 FORMULIERUNGEN NACH BESTIMMTER LAGERDAUER. MIT ZUNEHMENDER LAGERDAUER STIEG DER PDI ALLER FORMULIERUNGEN UND NÄHERTE SICH 1 ODER IST GLEICH 1.	57
ABBILDUNG 4.4: MESSUNG DES ZETAPOTENTIALS DURCH LASER-DOPPLER-ANEMOMETRIE. NACH ZUGABE VON $0,01\text{mol/L NaCl}$ SINKT DAS ZETAPOTENTIAL BEI ALLEN FORMULIERUNGEN AB, WEITERER ZUSATZ LÄSST DAS ZETAPOTENTIAL WIEDER STEIGEN, SODASS ES BEI 1mol/L NaCl BEINAHE $\pm 0\text{mV}$ ERREICHT.	60
ABBILDUNG 4.5: STARTPROFIL DER MESSUNG MIT EINER KONSTANTEN TRANSMISSION VON 109 mm BIS 129 mm . DADURCH WIRD SICHTBAR, DASS ES SICH UM EINE HOMOGENE PROBE HANDELT.	62
ABBILDUNG 4.6: ROHDATEN DER LUMISIZER-MESSUNG. ERSTE MESSWERTE SIND IN ROT DARGESTELLT, DIE LETZTEN MESSUNGEN IN GRÜN. EINE ERHÖHUNG DER TRANSMISSION IST FAST ÜBER DIE GESAMTE KÜVETTE ZU SEHEN (CA. $109\text{ mm} - 129\text{ mm}$). ZUSÄTZLICH TRITT AM BODEN DER KÜVETTE ($129-130\text{mm}$) SEDIMENTATION AUF, WAS AN DER VERRINGERUNG DER TRANSMISSION ZU SEHEN IST.	63
ABBILDUNG 4.7: ERSTES (ROT) UND LETZTES (GRÜN) PROFIL DER MESSUNG. DIE ÄNDERUNG DER TRANSMISSION IST DEUTLICH ZU ERKENNEN, WOMIT GEZEIGT WERDEN KANN, DASS SICH PARTIKEL IN DER SUSPENSION BEFINDEN UND DIESE SEDIMENTIEREN.	63
ABBILDUNG 4.8: DISPERSIONSANALYSE MIT REDUZIERTER ANZAHL VON MESSWERTEN. DURCH DIE VERWENDUNG NUR JEDER FÜNFTE MESSUNG KANN DER KONSTANTE SEDIMENTATIONSPROZESS EINFACHER BEOBACHTET UND DAS SIGNAL/RAUSCHVERHÄLTNIS VERBESSERT WERDEN.	64
ABBILDUNG 4.9: VERGLEICH DER NANOPARTIKEL MIT UNTERSCHIEDLICHER TENSIDKONZENTRATION. VON LINKS NACH RECHTS: AMPLITUDENBILD, BILD DER GEMESSENEN HÖHE UND PHASENBILD. AUF DEM PHASENBILD STELLEN DIE UNTERSCHIEDLICHEN HELLIGKEITSTUFEN ÄNDERUNGEN IN DER OBERFLÄCHENFESTIGKEIT DAR, WAS EINE MATERIALEIGENSCHAFT IST. A: 1% TWEEN 80; B: 2% TWEEN 80.	66
ABBILDUNG 4.10: VERGLEICH DER NANOPARTIKEL MIT UNTERSCHIEDLICHER TENSIDKONZENTRATION. VON LINKS NACH RECHTS: AMPLITUDENBILD, BILD DER GEMESSENEN HÖHE UND PHASENBILD. AUF DEM PHASENBILD STELLEN DIE UNTERSCHIEDLICHEN HELLIGKEITSTUFEN ÄNDERUNGEN IN DER OBERFLÄCHENFESTIGKEIT DAR, WAS EINE MATERIALEIGENSCHAFT IST. C: 3% TWEEN 80; D: 4% TWEEN 80.	67
ABBILDUNG 4.11: 3D-ÜBERSICHT DER HERGESTELLTEN PARTIKEL MIT UNTERSCHIEDLICHER TENSIDKONZENTRATION. LINKE SEITE DES BILDES: $1 \times 1\mu\text{m}$ SCANWEITE, RECHTE SEITE DES BILDES IST EINE VERGRÖßERUNG DER LINKEN:	

0,5x0,5 μ m SCANWEITE. AUF ALLEN BILDERN SIND RUNDE STRUKTUREN ZU ERKENNEN. A: 1% TWEEN 80; B: 2% TWEEN 80.	68
ABBILDUNG 4.12: 3D-ÜBERSICHT DER HERGESTELLTEN PARTIKEL MIT UNTERSCHIEDLICHER TENSIDKONZENTRATION. LINKE SEITE DES BILDES: 1x1 μ m SCANWEITE, RECHTE SEITE DES BILDES IST EINE VERGRÖßERUNG DER LINKEN: 0,5x0,5 μ m SCANWEITE. AUF ALLEN BILDERN SIND RUNDE STRUKTUREN ZU ERKENNEN. C: 3% TWEEN 80; D: 4% TWEEN 80.	69
ABBILDUNG 4.13: GRAFISCHE AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE DER LASERDIFFRAKTOMETRIE. A UND B: 1% IGE TWEEN 80 FORMULIERUNG. NUR EIN GERINGER VOLUMENANTEIL DER FORMULIERUNG IST IM NANOSKALIGEN BEREICH. C UND D: 2% IGE TWEEN 80 FORMULIERUNG. DIESE FORMULIERUNG HAT EINEN HOHEN VOLUMENANTEIL AN NANOBUBBLES.	70
ABBILDUNG 4.14: ERGEBNISSE DER LASERDIFFRAKTOMETRIE ALS WAHRSCHEINLICKEITSVERTEILUNG ANGEZEIGT. ZU SEHEN SIND JEWEILS DIE Dx (10), Dx (50), Dx (90), Dx (95), Dx (99) WERTE DER EINZELNEN TWEEN 80 FORMULIERUNGEN.	71
ABBILDUNG 4.15: 1% IGE TWEEN 80 NB-FORMULIERUNG NACH LAGERUNG, EXEMPLARISCH FÜR ALLE FORMULIERUNGEN. DER ANZAHL DER BUBBLES IN DER NANOSKALIGEN FRAKTION IST NUR NOCH SEHR GERING UND ES HABEN SICH BUBBLES IM MILLIMETERBEREICH GEBILDET.	73
ABBILDUNG 4.16: GRAFISCHE AUSWERTUNG DER GRÖßENANALYSE DER LASERDIFFRAKTOMETRIE. DIE BLAUE KURVE STELLT DIE ERSTE MESSUNG DAR, DANACH KOMMT ZEITLICH GESEHEN GRÜN, ROT, LILA UND BRAUN/ORANGE. DER VOLUMENANTEIL DER NANOSKALIGEN FRAKTION VERRINGERT SICH INNERHALB DER MESSREIHE DRASTISCH.	75
ABBILDUNG 4.17: AUSWERTUNG DER RASTERKRAFTMIKROSKOPISCHEN VERMESSUNG, BILDREIHE VON LINKS NACH RECHTS: AMPLITUDENBILD, HÖHENBILD UND PHASENBILD. A UND B: UM 90° VERDREHT GEMESSENE BILDER DER NANOBUBBLES. DIESE MESSTECHNIK WIRD ZUR QUALITÄTSKONTROLLE DER BILDDARSTELLUNG ANGEWENDET; C: MEHRERE NANOBUBBLES, SICHTBARER PHASENÜBERGANG AM LINKEN BILDRAND.	76
ABBILDUNG 4.18: AUSWERTUNG DER RASTERKRAFTMIKROSKOPISCHEN VERMESSUNG, BILDREIHE VON LINKS NACH RECHTS: AMPLITUDENBILD, HÖHENBILD UND PHASENBILD. D: VERGRÖßERUNG ZWEIER NANOBUBBLES. DAS PHASENBILD ZEIGT DEUTLICHE MATERIALUNTERSCHIEDE; E: VERGRÖßERUNG EINES EINZELNEN NANOBUBBLES. DIE HÜLLE IST OBEN AUFGERISSEN WODURCH DER MATERIALUNTERSCHIED ZWISCHEN HÜLLE UND KERN SICHTBAR WIRD.	77
ABBILDUNG 4.19: 3D-ÜBERSICHT DER HERGESTELLTEN NANOBUBBLES. A UND B: UM 90° VERDREHT GEMESSENE BILDER DER NANOBUBBLES. DIESE MESSTECHNIK WIRD ZUR QUALITÄTSKONTROLLE DER BILDDARSTELLUNG ANGEWENDET; C: NANOBUBBLEPOPULATION MIT MEHREREN GRÖßENFRAKTIONEN, SCANWEITE 2,5x2,5 μ m; D: VERGRÖßERUNG ZWEIER NANOBUBBLES, SCANWEITE 1x1 μ m. E: NOCHMALIGE REDUKTION DER SCANWEITE AUF 0,7x0,7 μ m UND SOMIT VERGRÖßERUNG EINES EINZELNEN NANOBUBBLES.	78
ABBILDUNG 4.20: AUFNAHMEN DER NANOBUBBLES, AUFGENOMMEN MIT EINEM RASTERELEKTRONENMIKROSKOP. A: ÜBERSICHTSBILD MIT EINER VERGRÖßERUNG VON 6000X, DER DUNKLE BEREICH ENTSTAND DURCH DAS VERGRÖßERN.	79
ABBILDUNG 4.21: AUFNAHMEN DER NANOBUBBLES, AUFGENOMMEN MIT EINEM RASTERELEKTRONENMIKROSKOP. A: BEI 30000FACHER VERGRÖßERUNG SIND SCHWACH, MIT DEN ROTEN PFEILEN GEKENNZEICHNET, DONUT-ARTIGE STRUKTUREN ZU BEOBACHTEN; B: 40000FACH VERGRÖßERUNG ZEIGT UNS EBENFALLS, DIESMAL DEUTLICHER SICHTBAR, DONUT-ARTIGE STRUKTUREN MIT BEILIEGENDEN KLEINEREN RUNDEN PARTIKELN.	80
ABBILDUNG 4.22: AUFNAHMEN DES TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPS. A: MEHRERE KUGELFÖRMIGE, ETWA 200NM GROßE STRUKTUREN; B: KUGELFÖRMIGE STRUKTUR MIT DEM DURCHMESSER VON ETWA 250NM UMGEBEN VON ZUSAMMENGEFLOSSENEM TENSID.	81
ABBILDUNG 4.23: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN EINER NANOBUBBLE-FORMULIERUNG. A-D: SICHTBARE POPULATION VON NANOBUBBLES. ALLE BEWEGEN SICH IN LÖSUNG UND VON EINZELNEN NANOBUBBLES GEHT EIN „FUNKELN“ AUS. DER MITTLERE GEMESSENE DURCHMESSER BETRUG 0,395 μ m \pm 0,054 μ m.	82

ABBILDUNG 4.24: EVALUIERUNG DER ÜBERLEBENSRATE VON HÜHNER-EMBRYOS NACH INTRAVENÖSER INJEKTION VON TWEEN 80/PBCA NANOPARTIKELN. AN TAG 10 WURDE INJIZIERT.	83
ABBILDUNG 4.25: AUSWERTUNG DES MTT-ASSAYS. BLANK IST DIE NEGATIVKONTROLLE, CONCENTRATED DER START DER VERDÜNNUNGSREIHE (8,1G/L PBCA), DIL. 1-15 DIE EINZELNEN VERDÜNNUNGSSCHRITTE UND TRITON X-100 DIENTE ALS POSITIVKONTROLLE. DEUTLICH ZU ERKENNEN IST, DASS AB DER SIEBTEN VERDÜNNUNG DIE VITALITÄT DER ZELLEN ZUNIMMT UND MIT DIL. 9 (0,032G/L PBCA) IHR MAXIMUM VON 99% ERREICHT. TRITON-X ALS POSITIVKONTROLLE WIES EINE ZELLVITALITÄT VON 26,2% AUF.	84
ABBILDUNG 4.26: SONOVUE® IM FLUSSMODELL, ZWISCHEN DEN EINZELNEN BILDERN LIEGEN JEWEILS 2 SEKUNDEN. BILD C WEIST DEN ERSTEN ERKENNBAREN ANSTIEG DES MITTLEREN GRAUWERTS AUF, BEI BILD F ERREICHT ER SEIN MAXIMUM UND NIMMT VON BILD G ÜBER H BIS I AB.	86
ABBILDUNG 4.27: 2%IGE TWEEN 80 FORMULIERUNG IM FLUSSMODELL, ZWISCHEN DEN EINZELNEN BILDERN LIEGEN JEWEILS 2 SEKUNDEN. BILD D WEIST DEN ERSTEN ERKENNBAREN ANSTIEG DES MITTLEREN GRAUWERTS AUF, BEI BILD G ERREICHT ER SEIN MAXIMUM UND NIMMT VON BILD H BIS I WIEDER AB.	86
ABBILDUNG 4.28: VERGLEICH DES MITTLEREN GRAUWERTANSTIEGS DER TWEEN 80 FORMULIERUNGEN MIT SONOVUE®. KEINE DER NB FORMULIERUNGEN ERREICHT EINEN WERT ÜBER 47%. DIE UNBEHANDELTE PROBE (TWEEN 80 NB+MB) ERREICHT EINEN WERT VON 94,1%.	87

8.3 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1.1: PBCA-FORMULIERUNGEN UND IHRE VERWENDUNGSZWECKE. NB: NANOBUBBLES; MB: MIKROBUBBLES	22
TABELLE 1.2: IMPEDANZEN UND SCHALLGESCHWINDIGKEIT IN UNTERSCHIEDLICHEN GEWEBEARTEN.	25
TABELLE 4.1: GRÖÖE UND PDI DER ENTSTANDENEN NANOPARTIKEL MIT UNTERSCHIEDLICHEN TENSIDKONZENTRATIONEN, SOWIE UNTERSCHIEDLICHEN HERSTELLUNGSMETHODEN ERMITTELT MIT HILFE DER DYNAMISCHEN LICHTSTREUUNG.	55
TABELLE 4.2: GRÖÖE UND PDI NACH LYOPHILISATION OHNE ZUGABE EINES KYROPROTEKTANTS, ERMITTELT MIT HILFE DER DYNAMISCHER LICHTSTREUUNG.	58
TABELLE 4.3: EINFLUSS DER ZUGABE VON NaCl-IONEN AUF DEN HYDRODYNAMISCHEN DURCHMESSER UND DEN PDI DER NANOPARTIKEL MIT UNTERSCHIEDLICHEN TENSIDKONZENTRATIONEN.	59
TABELLE 4.4: MITTLERE GRÖÖE UND DAZUGEHÖRIGE STANDARDABWEICHUNG ERMITTELT, AN JEWEILS 50 PARTIKELN MIT UNTERSCHIEDLICHEN TENSIDKONZENTRATIONEN.	61
TABELLE 4.5: ERGEBNISSE DER DISPERSIONSANALYSE. DER ERMESSENE MITTELWERT DES DURCHMESSERS LIEGT BEI 16,97NM±5,34. DER Dx(90) GIBT AN DAS 90% DES GEMESSENEN PARTIKELVOLUMENS ≤18,74NM SIND.	65
TABELLE 4.6: WAHRSCHEINLICHKEITSVERTEILUNG DER DURCHMESSER DER EINZELNEN TWEEN 80 NB-FORMULIERUNGEN IN µM.	72
TABELLE 4.7: WAHRSCHEINLICHKEITSVERTEILUNG DER DURCHMESSER DER EINZELNEN TWEEN 80 NB-FORMULIERUNGEN NACH 10MIN IN µM. ES IST KEINE NANOSKALIGE FRAKTION MEHR IN DER WAHRSCHEINLICHKEITSVERTEILUNG SICHTBAR.	73
TABELLE 4.8: EINFLUSS DER NaCl-KONZENTRATION AUF DIE STABILITÄT DER NANOBUBBLES. -: KEINE ERFOLGREICHE HERSTELLUNG; + ERFOLGREICHE HERSTELLUNG, KEINE VERBESSERUNG DER STABILITÄT; ++ ERFOLGREICHE HERSTELLUNG UND ERFOLGREICHE STABILISIERUNG.	74

8.4 Formelverzeichnis

FORMEL 1.1: ZUSAMMENHANG ZWISCHEN WELLENLÄNGE, GESCHWINDIGKEIT UND FREQUENZ.	24
FORMEL 1.2: ZUSAMMENHANG ZWISCHEN IMPEDANZ, SCHALLGESCHWINDIGKEIT UND DICHT.	24
FORMEL 1.3: PROZENTUALER REFLEKTIONS-KOEFFIZIENT ZUR BESTIMMUNG EINES GUTEN AUFLÖSUNGSVERMÖGENS.	25
FORMEL 3.1: STOKES-EINSTEIN-BEZIEHUNG ZUR BERECHNUNG DES HYDRODYNAMISCHEN DURCHMESSERS.	35
FORMEL 3.2: GLEICHUNG DER ELEKTROPHORETISCHEN BEWEGLICHKEIT.	36
FORMEL 3.3: STOKESCHES GESETZ UND UMFORMUNG ZUR RADIUSBERECHNUNG.	40
FORMEL 3.4: BEZIEHUNG NACH HELMHOLTZ ZUM ABSTAND ZWEIER SELBSTLEUCHTENDER OBJEKT-PUNKTE.	45

8.5 Danksagung

Bedanken möchte ich mich an erster Stelle besonders bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Udo Bakowsky für die Annahme als Doktorand, die interessante Fragestellung und dafür, dass er mich mit Vertrauen, viel Geduld und großer Hilfsbereitschaft während dieser Arbeit unterstützt hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Runkel für die Erstellung des Zweitgutachtens und für seine Hilfe und Unterstützung während meiner Promotion.

Frau Prof. Dr. Petersen und Herrn Prof. Dr. Krasel möchte ich für das Beiwohnen der Prüfungskommission als Nebenprüfer danken, sowie für die lehrreiche und spannende Zeit während des Studiums.

Weiter möchte ich mich ganz besonders bei Frau Dr. Jana Brüßler für die gute Betreuung und stetige Hilfsbereitschaft während der Durchführung meiner Forschungsarbeit, sowie für die Unterstützung und vielen lieben Worte bei der Erstellung der Dissertation danken.

Herrn Dr. Jens Schäfer und Boris Strehlow möchte ich für die Einführung in die Messmethoden und Geräte, ebenso wie für die Unterstützung in jeglichen technischen Fragen danken.

Bei Herrn Michael Hellwig möchte ich mich für die Aufnahmen der TEM Bilder bedanken.

Ein besonderer Dank geht an meine jetzigen Kollegen von der Arbeitsgruppe Bakowsky, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und eine tolles Arbeitsklima kreierten. Ich danke Michael Agel, Mohammed Alawak, Jürgen Bürding, Lili Duse, Konrad Engelhardt, Nathalie Goergen, Dr. Jarmilla Jedelská, Jennifer Lehmann, Susanne Lüttebrand, Julia Michaelis, Eva Mohr, Dr. Shashank Pinnapireddy, Nikola Plenagl, Eduard Preis, Michael Raschpichler, Benjamin Seitz und Hendrick Vögeling. Zusätzlich danke ich den Kollegen von der Arbeitsgruppe Keck und meinen ehemaligen Kollegen von der Arbeitsgruppe Schneider für die schöne Zeit während und nach der Arbeit.

Ich danke ganz besonders meiner Familie und Freundin für die Unterstützung, Liebe und Geduld während der Promotionszeit und Erstellung der Dissertation.

8.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich meine Dissertation

**„Herstellung und Charakterisierung schallaktiver
Polymerpartikel im nanoskaligen Bereich“**

selbstständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 01.11.2017